

PATENT COOPERATION TREATY

WO 01/00818
PCT/JP00/04261

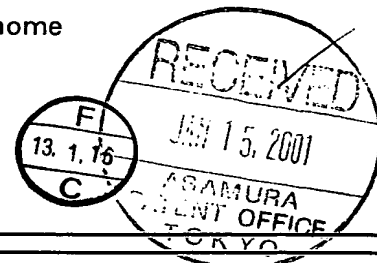
PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

To:

ASAMURA, Kiyoshi
New Ohtemachi Building
Room 331
2-1, Ohtemachi 2-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-0004
JAPON



小松

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 04 January 2001 (04.01.01)		
Applicant's or agent's file reference E5295-00		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/04261	International filing date (day/month/year) 28 June 2000 (28.06.00)	
		Priority date (day/month/year) 29 June 1999 (29.06.99)
Applicant SAKAI, Toshiyuki et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA,EP,IL,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 04 January 2001 (04.01.01) under No. WO 01/00818

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

(TRANSLATION)
PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL SEARCH REPORT
(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference E5295-00	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA220) as well as, what applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/JP00/04261	International Filing date (day/month/year) 28.06.00	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 29.06.99
Applicant: SAKAI, Toshiyuki et al		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless other wise indicated under this item.
- ☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:
- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1

- ☒ as suggested by the applicant.
- ☐ because the applicant failed to suggest a figure.
- ☐ because this figure better characterizes the invention.

☐ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04261

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/10, C12N 5/10, C12Q 1/68, A61K 48/00,
A61K 45/00, A61P 43/00, A61P 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/10, C12N 5/10, C12Q 1/68, A61K 48/00,
A61K 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Motonobu Osada et al., "Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53", Nature Medicine (1998), Vol.4, No.7, p.839-843	1-11
X	Martin Augustin et al., "Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related Ket gene to Chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse Chromosome 16", Mammalian Genome (1998), Vol.9, No.11, p.899-902	1-11
X	Hartwig Schmale et al., "A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53", Oncogene (1997), Vol.15, No.11, p.1363-1367	1-11
P, X	WO, 99/50412, A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 07 October, 1999 (07.10.99) (Family: none)	1-11
P, X	WO, 99/61610, A2 (FRAUNHOFER GES FOERDERUNG ANGEWANDTEN), 02 December, 1999 (02.12.99) & DE, 19822985, C1	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
14 September, 2000 (14.09.00)

Date of mailing of the international search report
26 September, 2000 (26.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

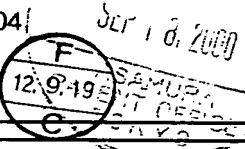
小松

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

ASAMURA, Kiyoshi
New Ohtemachi Building
Room 331
2-1, Ohtemachi 2-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-0004
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 01 September 2000 (01.09.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference <u>E5295.00</u>	
International application No. PCT/JP00/04261	International filing date (day/month/year) 28 June 2000 (28.06.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 29 June 1999 (29.06.99)
Applicant SAKAI, Toshiyuki et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
29 June 1999 (29.06.99)	11/183195	JP	04 Augu 2000 (04.08.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Sean Taylor Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC 31 AUG 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 E5295-00	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04261	国際出願日 (日.月.年) 28.06.00	優先日 (日.月.年) 29.06.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12N15/10、C12N5/10、C12Q1/68、A61K48/00、A61K45/00、A61P43/00、A61P35/00		
出願人 (氏名又は名称) 酒井 敏行		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
I ☒ 国際予備審査報告の基礎
II ☐ 優先権
III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV ☐ 発明の単一性の欠如
V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI ☒ ある種の引用文献
VII ☐ 国際出願の不備
VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.11.00	国際予備審査報告を作成した日 17.08.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 木村 順子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 9641

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-11	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-11	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-11	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

引用文献1: Nature Medicine, 1998, Vol. 4, No. 7, pp. 839-843.

引用文献2: Mammalian Genome, 1998, Vol. 9, No. 11, pp. 889-902.

請求の範囲 1-11

請求の範囲 1-11 は、国際調査報告に引用された文献1及び文献2より、進歩性を有しない。

引用文献1には、p53と類似の蛋白質であるヒト由来p51のアミノ酸配列が記載されている(引用文献1第840頁Fig.1a参照)。

引用文献2には、p53と類似の蛋白質であるヒト由来のKetのアミノ酸配列が記載されている(引用文献2第900頁Fig.1参照)。

ここで、蛋白質のアミノ酸配列をもとにプローブを作製し、ゲノムライブラリーをスクリーニングして、該蛋白質の制御領域を探索することは、本願出願前当業者にとって周知の課題であり、プロモーターが、すべてではないが、通常、構造遺伝子のすぐ上流に位置することも、本願出願前周知の事項と認められる(要すれば、緒方宣邦、野島博著、株式会社羊土社、遺伝子工学キーワードブック、1996年4月25日発行、p.350等参照)。

してみると、引用文献1及び2に記載された蛋白質のアミノ酸配列をもとにプローブを作製して、ゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、構造遺伝子上流領域を重点的に探索することによって、プロモーター領域をクローニングし、配列を決定することは、当業者であれば、容易に想到し得ること認められる。

また、このようにして得られたDNAを適当なプラスミドに組み込み、細胞を形質転換すること、並びに他の類似の配列を有する遺伝子をクローニングすることも、当業者が適宜なし得ることと認められる。

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO 99/50412 A1 [E, X]	07. 10. 99	24. 03. 99	27. 03. 98
WO 99/61610 A2 [E, X]	02. 12. 99	25. 05. 99	25. 05. 98

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

一般に、所望の性質を特定することのみで、その性質を有する化合物自体を把握することは困難であるから、化学構造等の有効成分を得るための手がかりが十分記載されていない明細書は、発明の実施に必要な有効成分の入手過程において、無数の化合物を製造、スクリーニングして、当該性質を有するか否かを確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を要するものであり、当業者が発明を実施することができる程度に、明確かつ十分に記載されていないものと判断される。

これを請求の範囲10及び11に記載された発明についてみると、本願明細書には、p51遺伝子の発現を上昇あるいは阻害させる化合物を識別するためのスクリーニング方法と、該方法により得られたp51遺伝子の発現を上昇させる化合物の具体例としてトリコスタチンAは記載されているものの、上記特定の化合物以外の有効成分を得るための化学構造等の手がかりは記載されておらず、p51遺伝子の発現を阻害させる化合物については具体例もなく、かつ、化学構造等の手がかりが出願時に当業者に推認できたものとも認められないので、それら以外の請求項に包含される有効成分を当業者が理解できず、発明の実施にあたり、無数の化合物を製造、スクリーニングして確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を要するものと認められる。

従って、請求の範囲10及び11に記載された発明について、本願明細書に、当業者が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない、と認められる。

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

04 January 2001 (04.01.01)

International application No.:

PCT/JP00/04261

Applicant's or agent's file reference:

E5295-00

International filing date:

28 June 2000 (28.06.00)

Priority date:

29 June 1999 (29.06.99)

Applicant:

SAKAI, Toshiyuki et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

27 November 2000 (27.11.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年1 月4 日 (04.01.2001)

PCT

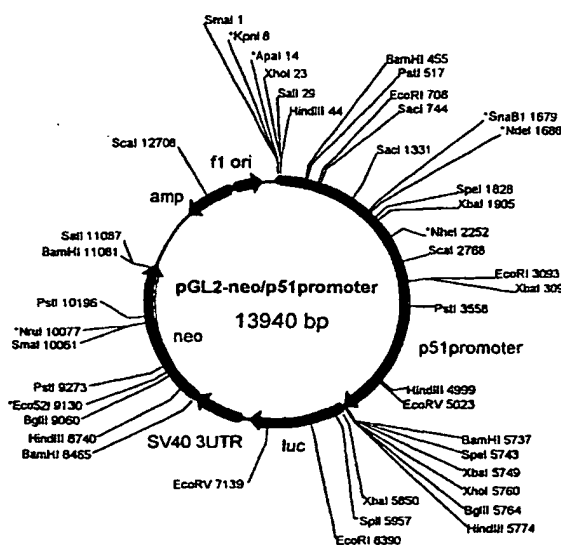
(10) 国際公開番号
WO 01/00818 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/10, 5/10, C12Q 1/68, A61K 48/00, 45/00, A61P 43/00, 35/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04261
- (22) 国際出願日: 2000 年6 月28 日 (28.06.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/183195 1999 年6 月29 日 (29.06.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本化薬株式会社 (NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒102-8172 東京都千代田区富士見一丁目11 番2号 Tokyo (JP).
- (72) 出願人 および
(72) 発明者: 酒井敏行 (SAKAI, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒606-0957 京都府京都市左京区松ヶ崎小脇町28-1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加々谷重英 (KAGAYA, Shigehide) [JP/JP]; 〒330-0835 埼玉県大宮市北袋町2-336 Saitama (JP). 佐藤学道 (SATO, Takamichi) [JP/JP]; 〒338-0001 埼玉県与野市上落合6-8-22 Saitama (JP). 助永義和 (SUKENAGA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒165-0023 東京都中野区江原町2-21-15-102 Tokyo (JP). 藤井秀二 (FUJII, Hideji) [JP/JP]; 〒151-0071 東京都渋谷区本町3-48-21-1201 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, IL, JP, US.

[続葉有]

(54) Title: GENE ENCODING PROMOTER DOMAIN OF TUMOR SUPPRESSOR GENE P51 AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 癌抑制遺伝子p51プロモーター領域をコードする遺伝子及びその用途



(57) Abstract: A gene encoding the promoter domain of a protein p51 which is capable of inducing cell death; and a gene encoding the 5'-nontranslation domain of p51. These genes are useful in diagnosing and treating diseases typified by cancer caused by abnormal regulation of cell proliferation. Antisense DNAs and antisense RNAs of these genes; nucleic acid probes comprising the full sequences of these genes or parts thereof; a method for detecting the above genes or genes analogous thereto by using these nucleic acid probes; transformants having the above genes transferred thereinto; a method for screening a drug by using the same; and the like. These genes are also useful in diagnosing and treating diseases such as cancer.

[続葉有]

WO 01/00818 A1



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

本発明により、細胞死誘導能を示す蛋白質p51のプロモーター領域をコードする遺伝子、並びにp51の5'ダッシュ非翻訳領域をコードする遺伝子が提供される。これら遺伝子は、細胞増殖制御の異常で起こる癌を始めとする疾患の診断、治療に有用である。さらに本発明により、これら遺伝子のアンチセンスDNA及びアンチセンスRNA、これら遺伝子の一部又は全部からなる核酸プローブ、その核酸プローブを用いた上記本発明遺伝子あるいはその類似遺伝子の検出方法、上記本発明遺伝子を導入させた形質転換体、これらを用いた薬剤のスクリーニング法などが提供される。これら遺伝子は癌等の疾患の診断、治療にも有用である。

明 細 書

癌抑制遺伝子p51プロモーター領域をコードする遺伝子及びその用途

5 技術分野

本発明は、細胞死誘導能及び細胞増殖抑制能等を有する蛋白質p51のプロモーター領域をコードする遺伝子及びp51の5'ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子に関する。また、本発明は、これら遺伝子の一連の用途に関する。

背景技術

- 10 癌抑制遺伝子p53はアポトーシス誘導能、細胞周期停止能、DNA傷害修復能など多様な機能を有する蛋白質をコードしている。また、p53は転写因子であり、様々な蛋白質の発現を制御していることが分かってきた。現在、この蛋白質は細胞増殖制御に中心的な機能を果たしていると考えられている。また、癌細胞においては、約半数でp53の変異が認められ、異常増殖や制癌剤耐性の主因となっていることが報告されてきている。ごく最近まで、p53様の構造、機能を有する蛋白質は全く知られていなかったが、近年二つの新規p53様分子が報告された。一つはp73 (Cell誌 第90巻 809-819頁 1997年) であり、もう一つが、p51 (Nature Medicine誌 第4巻 839-843頁 1998年) である。p51に関しては、同一遺伝子にコードされる蛋白質がp63の名称で報告されている (Molecular Cell
- 20 誌、第2巻、305-316頁、1998年)。p51は構造的にp53に極めて類似しており、また、p53同様、細胞周期進行抑制蛋白質p21の転写活性化能を有していることから機能的にもp53と相同であることが示唆されている。さらにp51は、p53同様、細胞死誘導能、細胞増殖抑制能等を有していることが報告されている。しかし一方、p53と異なり、p51は癌細胞においてもほとんど変異が認められないことが示されている。また、p51は、筋肉細胞等、ごく限局された臓器にのみ発現していることが明らかになっている。
- 25

発明の開示

本発明の目的は、癌抑制遺伝子p51のプロモーター領域をコードする遺伝子及びp51の5'ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子を明らかにし、これら

遺伝子のクローニング方法を提供すること、さらにこれら遺伝子を用いた新規薬剤探索方法を提供すること、さらにこれら遺伝子を用いた新規遺伝子治療方法を提供すること等である。

本発明者は、ヒトゲノムライブラリ中にp51プロモーターを含む遺伝子断片を見出すべく鋭意研究し、p51プロモーター領域を有する遺伝子配列、並びにp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子配列を決定し、本発明を完成した。

即ち、p51mRNAに相補的なcDNAと同様の配列を含むヒトゲノム断片を、ブランクハイブリダイゼーションスクリーニング法により検索し、採取した。さらに、この遺伝子断片の塩基配列を決定することによって、この中にp51プロモーター領域及びp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域と推定される領域が含まれていることを確認した。さらに、この遺伝子断片をルシフェラーゼレポーター遺伝子と接続したプラスミドを構築し、これをヒト細胞株に導入した形質転換体を作製した。更に、この形質転換体を解析することによって、該遺伝子がプロモーター能を有することを発見した。また、これらを用いたp51プロモーターに作用する物質のスクリーニング方法、及びこのプロモーター活性を増強する薬剤が、p53依存性アポトーシス異常が関与する疾患の治療薬、例えば制癌剤となる可能性を見出した。

従って、本発明は、以下の（１）、（２）、（３）、（４）、（５）又は（６）に示すp51プロモーター領域をコードする遺伝子に関する。

- （１）配列表の配列番号：１に示す塩基配列を有するp51プロモーター領域をコードするDNA；
- （２）配列表の配列番号：１に示す塩基配列において１もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター能を有するDNA；
- （３）配列表の配列番号：１に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター能を有するDNA；
- （４）配列表の配列番号：２に示す塩基配列を有する、p51プロモーター領域及びp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNA；

- (5) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター能を有するDNA；
- (6) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター能を有するDNA。

更に、本発明は、以下の(7)、(8)又は(9)に示すp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子に関する。

- (7) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列を有するDNA；
- (8) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつ上記(7)のDNAと同様の機能を有するDNA；
- (9) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件でハイブリダイズし、かつ上記(7)のDNAと同様の機能を有するDNA。

更に、本発明は、上記(1)から(6)の遺伝子を含むことを特徴とする組換え体プラスミドに関する。

- 更に、本発明は、上記組換え体プラスミドを含む形質転換体又は形質導入体に関する。

更に、本発明は、上記(1)から(9)の遺伝子の塩基配列の全体又は部分からなる核酸プローブに関する。

更に、本発明は、上記核酸プローブを用いたハイブリダイゼーションによるp51プロモータークローニング方法に関する。

- 更に、本発明は、上記(1)から(9)の遺伝子の全体又は部分に対してアンチセンスであり、p51プロモーター能の機能を修飾可能なDNA配列に関する。

更に、本発明は、上記(1)から(9)の遺伝子の全体又は部分に対してアンチセンスであり、p51プロモーター能の機能を修飾可能なRNA配列に関する。

更に、本発明は、上記形質転換体又は上記形質導入体を用いたp51プロモータ

ーに作用する薬剤のスクリーニング方法に関する。

更に、本発明は、上記スクリーニング方法により選択された、p51遺伝子の発現を上昇あるいは阻害する化合物に関する。

更に、本発明は、上記DNA又は上記RNAを含む医薬製剤に関する。

5 図面の簡単な説明

図1は、pGL2-neo/p51promoterの制限酵素地図を示す図である。図中のampはアンピシリン耐性遺伝子、neoはネオマイシン耐性遺伝子、lucはルシフェラーゼ遺伝子を示すものである。また、制限酵素名の左に*印が印されているものは、このベクターをただ一点で切断する酵素である。

- 10 図2は、大腸癌由来細胞株HCT 1 1 6に、様々な刺激を加えた際のp51の発現量をノーザンブロッティングの手法を用いて解析した図である。各レーンには、レーン1、2：タキソール（1 μ g/ml、10 μ g/ml）処理細胞、レーン3、4：トリコスタチンA（0.1 μ g/ml、1 μ g/ml）処理細胞、レーン5、6：放射線照射（一平方メートル当たり50J、100J）処理細胞、レーン7、8：ビタミンD3（10nM、100nM）処理細胞、レーン9、10：ビンクリスチン（1 μ g/ml、10 μ g/ml）処理細胞、レーン11、12：ワートマニン（0.1 μ M、1 μ M）処理細胞のRNA各20 μ gがプロットされている。矢印で示した位置にp51プローブと反応するバンドが認められる。

- 図3、大腸癌由来細胞株HCT 1 1 6に、pGL2-neo/p51promoter又は、pGL2-neo
20 ベクター各2 μ gを導入した24時間後、0又は1 μ g/mlトリコスタチンA（TsA）を添加し、さらに24時間培養した。これらの細胞中のルシフェラーゼ活性を測定することによって、単離した遺伝子断片のプロモーター活性の検討を行った。ネガティブコントロール細胞としてはpcDNA3/lacZ 2 μ gを導入した細胞を用いた。結果、pGL2-neo/p51promoter導入細胞抽出液はpGL2-neo導入細胞抽出
25 液に比べて有意に高い蛍光強度を示すことがわかった。また、トリコスタチンAの投与によってpGL2-neo/p51promoter導入細胞抽出液中の化学発光強度はさらに増強された。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明をより具体的に説明する。

(1) 本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子

(1-1) 本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子を単離するためには、ヒトゲノムDNAライブラリを作製し、このライブラリの中から、前記Nature Medicine誌の文献記載の配列の一部を利用し、p51mRNAの5'ダッシュ末端側非翻訳領域と相補的なcDNAとハイブリダイズするcDNA分子を単離、クローニングして、

5 p51プロモーター領域をコードする遺伝子を単離する事ができる。

本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子の塩基配列は、配列表の配列番号1に示したとおりである。この遺伝子配列において、TATAボックスが同配列表の第5630番目から第5636番目の塩基間と、第5659番目から第5665番目までの塩基間にコードされている。これは、p51A蛋白質のmRNA (p51AmRNA) の配列として報告されている遺伝子配列 (GenBankAB016072) の上流47ベースと18ベースの位置に存在する。さらに、筋肉細胞特異的転写因子であることが知られているMEF2の結合部位が、同配列表の第1211番目から第1220番目の塩基間に存在する。また、配列表の配列番号1に示したp51プロ

10 モーター領域をコードする遺伝子とホモロジーを有する遺伝子をデータベースにより検索したが、全長に渡り30%以上のホモロジーを有するものは存在しなかった。

更に、配列表の配列番号1に示される塩基配列を有する遺伝子の機能を確認する目的で、以後の実施例に示すように、配列表の配列番号1に示される塩基配列

20 を有する遺伝子とルシフェラーゼレポーター遺伝子を接続したプラスミドを構築し、ヒト培養細胞株中で発現させた形質転換体を作製した。この形質転換体はコントロール群に比べて有意にルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を示した。さらに形質転換体を用いた簡易スクリーニングによって、トリコスタチンAにp51プロモーター活性化能を見出した。1 μ g/mlのトリコスタチンA (和光純薬社製)

25 はp51をヒト培養細胞株中で転写活性化し、また、この条件下において、単離したp51プロモーター領域を有する遺伝子のプロモーター活性がさらに著しく上昇することを確認した。即ち、これらの結果より、配列表の配列番号1に示した塩基配列を有する遺伝子が、p51プロモーターとしての機能を有することを明らかにした。

(1-2) 配列表の配列番号：1に示す塩基配列において、1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター活性を有するDNAも本発明の範囲内のものである。塩基の欠失、置換もしくは付加は、実質的にそのプロモーター全体の構造および機能に影響を与えない程度のものである。これらの塩基の欠失、置換もしくは付加の程度は、p51プロモーター活性を有し、もとの塩基配列との相同性が80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは99%以上のものが許容し得る。

(1-3) 配列表の配列番号：1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター活性を有するDNAも本発明の範囲内のものである。このようなハイブリダイズするDNA変異体としては、部位特異的変異導入、変異剤処理によるランダム変異、制限酵素切断によるDNA断片の変異、欠失、連結等により部分的にDNA配列が変化したものが挙げられる。これらのDNA変異体が配列番号1に示すコード遺伝子とハイブリダイズする程度としては、ストリンジェントな条件下、例えば、ハイブリダイゼーション溶液（50mM トリス-塩酸（pH 7.5）、1M 塩化ナトリウム、1%ドデシル硫酸ナトリウム、10%デキストラン硫酸、0.2mg/ml酵母RNA、0.2mg/ml サケ精子DNA）中で上記メンブランを65℃にて、1時間保温し、プレハイブリダイゼーションとし、次に、放射性同位体標識したcDNA断片を放射性同位体量にして100万dpm/mlとなるように添加し、65℃にて、16時間保温することにより、ハイブリダイゼーションを行い、続いて、このメンブランを、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む2×SSC溶液（300mM 塩化ナトリウム、30mM クエン酸三ナトリウム）中で、65℃にて、30分間洗浄した後、オートラジオグラフィで解析した際にX線フィルム上でハイブリダイズが確認されるものである。

(1-4) 配列表の配列番号：2に示される、p51のプロモーター領域及びp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNAも本発明の範囲内のものである。配列番号：2における5677番目から5960番目の塩基配列が5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNAに相当する。その内で5767番目から5960番目の塩基配列がイントロン領域に相当する。

(1-5) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列において、1もしくは複数個

の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター活性を有するDNAも本発明の範囲内のものである。塩基の欠失、置換もしくは付加は、実質的にそのプロモーター全体の構造および機能に影響を与えない程度のものである。これらの塩基の欠失、置換もしくは付加の程度は、p51プロモーター活性を有し、もとの塩基配列との相同性が80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは99%以上のものが許容し得る。

- (1-6) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター能を有するDNAも本発明の範囲内のものである。このようなハイブリダイズするDNA変異体としては、上記
- 10 (1-3)において例示したと同様のものが挙げられる。これらのDNA変異体が配列番号2に示す遺伝子とハイブリダイズする程度としては、上記(1-3)において記載したと同様のストリンジェントな条件で同様にハイブリダイズが確認されるものである。

(2) 本発明のp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子

- 15 (2-1) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列を有するDNAは、p51のプロモーター領域の下流に位置する、p51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNAであり、かかるDNAも本発明の範囲内のものである。その内で5767番目から5960番目の塩基配列がイントロン領域に相当する。p51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNAは、
- 20 以後に述べるように、例えば、その一部又は全部を遺伝子のクローニングのための核酸プローブとして利用することができる。

- (2-2) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5677番目から5960番目の塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列を有し、かつ上記(2-1)のDNAと同様の機能を有するDNAも本発明の範囲内のものである。塩基の欠失、置換もしくは付加は、実質的にそのDNAの構造および機能に影響を与えない程度のものである。これらの塩基の欠失、置換もしくは付加の程度は、上記(2-1)のDNAと同様の機能を有し、もとの塩基配列との相同性が80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは99%以上のものが許容し得る。
- 25

(2-3) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5 6 7 7番目から5 9 6 0番目の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ上記(2-1)のDNAと同様の機能を有するDNAも本発明の範囲内のものである。このようなハイブリダイズするDNA変異体としては上記(1-3)において例示したと同様のものが挙げられる。これらのDNA変異体が配列番号2に示す遺伝子とハイブリダイズする程度としては、上記(1-3)において記載したと同様のストリンジェントな条件で同様にハイブリダイズが確認されるものである。

10 (3) 本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子を含む組換え体プラスミド

本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子を含む組換え体プラスミドを構築することで、該遺伝子が大腸菌などに安定に保持させることが可能であり、この際ベクターとしては、一般に使われるものはすべて使用可能であるが、例えば、pBluescript II SK(-)等がある。以後に述べる実施例では、p51プロモーター領域を有する遺伝子をpBluescript II SK(-)に組み込んだpBS/p51 promoterが例示
15 されている。これらプラスミドを必要に応じて適当な制限酵素等で切断した後、適当なベクターに接続し、プロモーター活性測定用プラスミドとすることが出来る。プロモーター活性測定用プラスミドとしてはpGL2等のプラスミドをベクターとして使用すればよい。

20 (4) 形質転換体又は形質導入体

上記の組換え体プラスミドを、適当な宿主に導入して形質転換体または形質導入体を構築することが出来る。大腸菌、酵母、哺乳類細胞が使用可能である。プロモーター活性測定用プラスミドを保持する形質転換体は、上記のように活性測定用ベクターに組み込んだ組換え体プラスミドを適当な宿主に形質転換すること
25 により得られる。例えば、図1に示すような組換え体プラスミドを哺乳類培養細胞に導入して形質転換体が得られる。形質転換体又は形質導入体は適当な栄養培地で培養し、その細胞中のレポーター遺伝子の発現量を測定することによってプロモーター活性を測定することが出来る。

(5) 核酸プローブ、それを用いた遺伝子のクローニング及び検出

本発明では上記のようにして得られた本発明のp51プロモーター領域を有する遺伝子の一部又は全部、あるいは本発明のp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子の一部又は全部を、以下に述べるような遺伝子のクローニングなどに用いるための核酸プローブとして利用できる。本発明遺伝子の一部からなる核酸プローブとしては、15ヌクレオチド以上のオリゴヌクレオチドからなる核酸プローブが挙げられる。該核酸プローブは、上記本発明遺伝子又はその遺伝子断片を適当なベクターに接続し、細菌に導入し、複製させ、菌体破砕液からフェノールなどにより抽出、そしてベクターと接続した部位を認識する制限酵素で切断、電気泳動後、ゲルより切り出せば調製できる。また、該核酸プローブは、
5
10 配列表の配列番号1又は2の塩基配列に基づき、DNA合成機による化学合成や、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）法による遺伝子増幅技術によっても調製できる。該核酸プローブは使用時の検出感度を上げるために放射性同位体や、蛍光で標識することもできる。

該核酸プローブは、プロモーター能を有する上記以外の遺伝子のクローニング方法、ならびにその下流の蛋白質をコードする遺伝子のクローニング方法に用いることができる。即ち、該核酸プローブを用いて、ハイブリダイゼーション法、又は、PCR法により、各種の生物組織のゲノムライブラリーを探索すれば、本発明遺伝子と同様の機能を有する遺伝子、または、その下流に存在する蛋白質をコードする遺伝子を単離することができる。

20 (6) アンチセンスDNA及びアンチセンスRNA

本発明では、上記のp51プロモーター領域を有する遺伝子のアンチセンスDNA及びアンチセンスRNA、並びにp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域を有する遺伝子のアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAも提供される。これらのアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAを細胞に導入することにより、p51をコードする遺伝子の発現を抑制すること又は上昇せしむることが可能である。導入するアンチセンスDNAとしては、例えば配列表の配列番号1又は2の対応するアンチセンスDNA又はその一部を用いることができる。該アンチセンスDNAの例を配列表の配列番号3に示す。これは、配列表の配列番号1のp51プロモーター能を有する遺伝子のアンチセンスDNAの配列を示すものである。アンチセンスDNAとしては、例えば、こ
25

これらのアンチセンスDNAの一部を適当に切断して得た断片を用いても良いし、これらのアンチセンスDNA配列に基づいて合成したDNAを用いても良い。

- アンチセンスRNAとしては、例えば配列表の配列番号1又は2の対応するアンチセンスRNA又はその一部を用いることができる。該アンチセンスRNAの例を配列表の配列番号4に示す。これは、配列表の配列番号1のp51プロモーター能を有する遺伝子のアンチセンスRNAの配列を示すものである。アンチセンスRNAとしては、例えば、これらのアンチセンスRNAの一部を適当に切断して得た断片を用いても良いし、これらのアンチセンスRNA配列に基づいて合成したRNAを用いても良い。また、例えば配列表の配列番号1のp51プロモーター能を有する遺伝子又はその一部を適当なベクターに接続し、細菌に導入し、複製させ、菌体破碎液からフェノールなどにより抽出したものを鋳型として、イン・ビトロ転写系でRNAポリメラーゼを作用させて作製したRNAを用いても良い。アンチセンスDNA及びアンチセンスRNAは生体内で分解されにくい様に、更に、細胞膜を通過できるように化学的な修飾を施しておくことができる。このようにして調製したアンチセンスDNA及びアンチセンスRNAは、悪性腫瘍をはじめとする各種疾患の治療に使用することができる。

(7) 薬剤のスクリーニング

- 本発明では、本発明の形質転換体又は形質導入体を用いた新規薬剤のスクリーニング方法が提供される。例えば、ルシフェラーゼレポーター遺伝子と該遺伝子を接続した組換え体プラスミドを導入した培養細胞を用い、ルシフェラーゼ活性を上昇させる薬剤をスクリーニングすることによって、p51プロモーター活性化能を有しp51蛋白質の発現を上昇させる物質を発見することができる。

- 組換え体プラスミドを導入する培養細胞としては、実施例中で用いた大腸癌培養細胞株HCT-116細胞株を始め、継代培養可能な如何なる培養細胞株も使用可能である。組換えプラスミドとしては、実施例中で用いたpGL2プラスミドにネオマイシン遺伝子を接続したpGL2-neoベクターを始め、レポーター遺伝子を含むあらゆるベクターが使用可能である。スクリーニング系の構築にあたっては、培養細胞株を選択し、スクリーニング用ベクターをリポフェクション法などを用いて導入する。この形質転換細胞を選択薬剤とともに培養することによって、スクリー

ニング用ベクターを含む細胞のみを生育させることができる。これらの細胞はこのままスクリーニングに用いても良いし、クローニングすることによって、単一の細胞株として調製した後、スクリーニングに用いても良い。これらの細胞に、サンプルを添加し、そのレポーター蛋白質の活性を測定することによって、p51
5 の転写を調節する物質を探索することができる。サンプルとしては、例えば微生物二次代謝産物を用いても良いし、合成した化合物を用いても良い。p51のプロモーターを活性化する物質は、p51蛋白質の産生を上昇させ、p53が変異した癌細胞にも増殖抑制効果を示し、新規制癌剤になると期待される。

(8) 医薬製剤

- 10 p51は筋肉細胞等非常に限局した組織にのみ発現が認められる。従って、本発明のp51プロモーター能を有する遺伝子の下流に目的の遺伝子を接続し、特異的組織のみで目的遺伝子を発現させることにより遺伝子治療ベクターとして用い得る。また、上記したアンチセンスDNA、アンチセンスRNAは悪性腫瘍をはじめとする各種疾患の治療薬剤となりうる。
- 15 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

p51プロモーター領域をコードする新規遺伝子断片の単離

(1-1) スクリーニング用プローブの調製

- 20 p51プロモーター領域をコードする新規遺伝子断片のスクリーニング用プローブを調製した。その方法として、RT-PCR法を用いた。以下に実験手順を示す。ヒト筋肉由来RNA (OriGene社製) 6 μ gを逆転写酵素Superscript (GIBCO BRL 社製) 200ユニットを用いてcDNAとした。続いて、これを鋳型として、配列番号5、6に示されるプライマーセット、並びに配列表の配列番号7、8に示される
25 プライマーセットを用い、PCR法にてp51mRNA由来遺伝子断片の増幅を試みた。前者のプライマーセットを用いて増幅される遺伝子は、現在までに報告されているp51AmRNAの5ダッシュ末端非翻訳領域143ベースならびにオープンリーディングフレームの5ダッシュ末端側165ベースをコードし、後者のプライマーセットを用いて増幅される遺伝子はp51AmRNAオープンリーディングフレーム全長をコ

ードする。前者の遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号 9 に示す。PCR法を実施するにあたり、DNAポリメラーゼはEX Taq (宝酒造社製) を用い、PCR条件は 9 5 °C (1 分)、5 5 °C (1 分)、7 2 °C (1 分) を 1 サイクルとし、3 0 サイクル増幅した。PCR増幅産物はフェノール処理、クロロホルム処理による除蛋白質後、
5 エタノール沈殿した。続いて、このDNAを 7 0 %エタノールで洗浄し、滅菌水に溶解した。次に、これらの精製DNAと、2 0 ngの大腸菌用ベクターpBluescript KS(+) (東洋紡社製) を制限酵素EcoRV (宝酒造社製) で切断後、その切断末端にチミンを一つ付加したDNA (以下pBS/EcoRV TAと表記する) とをDNAライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて接続した (以下、配列番号 5、6 に示される
10 プライマーセットにより得られる増幅遺伝子を含むプラスミドをpBS/p51-1、配列番号 7、8 に示されるプライマーセットにより得られる増幅遺伝子を含むプラスミドをpBS/p51A ORFと記載する)。なお、増幅遺伝子に突然変異のないことを、pBS/p51-1、pBS/p51A ORFの塩基配列を決定することにより確認した。塩基配列の決定は、自動シーケンサーLONG READIR 4 2 0 0 (ライカ社製) を用いて行
15 った。続いて、pBS/p51-1を、制限酵素EcoRV並びにPstI (東洋紡社製) で切断後、0. 8 %アガロース電気泳動により分画し、抽出、精製した。精製にはEASYTRAP (宝酒造社製) を用いた。この精製DNAをスクリーニング用プローブの鋳型として用いることとした。

(1 - 2) p51プロモーター領域をコードする新規遺伝子断片のスクリーニ
20 グ

続いて、ヒトゲノムライブラリより、p51プロモーター領域をコードする遺伝子断片のスクリーニングを試みた。ヒトゲノムライブラリとして、Easy-to-Handle Eukaryotic Genomic Library from human (Mo Bi Tec社製) を用いた。このライブラリの感染効率は 1 μ lあたり 3 0 0 万プラークフォーミングユニットであった。このライブラリを用いて、プラークハイブリダイゼーション用のメン
25 ブランを以下の方法に従って調製した。0. 0 2 μ lのライブラリ溶液と、0. 9 mlのC6 0 0大腸菌溶液 (大腸菌株C6 0 0を 0. 2 %マルトース、1 0 mM 硫酸マグネシウムを含むLB培地 (0. 5 %イーストエキストラクト、1 %ペプトン、0. 5 %塩化ナトリウム) 5 0 ml中にて、3 7 °Cにて、1 6 時間振盪培養し、5

000回転、5分間の遠心にて回収後、25mlの10mM 硫酸マグネシウムに懸濁したもの)を混合し、37℃にて、15分間保温し、ファージを感染させた。ここに、融解後47℃にて、保温した7mlのLBソフトアガー(0.5%イーストエキストラクト、1%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、10mM 硫酸マグネシウムに0.7%寒天を加え寒天培地としたもの)を加え、穏やかに混和後、各直径150mmのLB-硫酸マグネシウムプレート(0.5%イーストエキストラクト、1%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、10mM 硫酸マグネシウムに1.5%寒天を加えて寒天培地としたもの)に散布した。この操作により、一枚のプレートあたり6万個のプラークが出現した。同様の手順で計23枚のプレートに散布を行った。これらを37℃にて、16時間培養し、プラークを形成させた。次に、このプレートを4℃にて、1時間冷却した後、ナイロンメンブラン、コロニーブラークスクリーン(NEN社製)にプラークを接着させた。このメンブランを乾燥後、500mlのアルカリ液(0.2N水酸化ナトリウム、1.5M 塩化ナトリウム)中で、室温にて2分間変性し、続いて500mlの中和液(0.5M トリシュー塩酸(pH7.2)、1.5M 塩化ナトリウム、1mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)中で、室温にて2分間中和した。次に、このメンブランを3×SSC溶液(450mM 塩化ナトリウム、45mM クエン酸三ナトリウム)中、55℃にて、1時間保温した後、乾燥し、プラークハイブリダイゼーション用メンブランとした。pBS/p51-1を、制限酵素EcoRV並びにPstIで切断、精製した前述のcDNA断片50ngをPrime-It II(ストラタジーン社製)を用いて放射性同位体標識し、スクリーニング用プローブとした。

次に、このメンブランを用いてプラークハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション溶液(50mM トリシュー塩酸(pH7.5)、1M 塩化ナトリウム、1%ドデシル硫酸ナトリウム、10%デキストラン硫酸、0.2mg/ml 酵母RNA、0.2mg/ml サケ精子DNA)50ml中で上記メンブランを65℃にて、1時間保温し、プレハイブリダイゼーションとした。次に、放射性同位体標識したcDNA断片を放射性同位体量にして100万dpm/mlとなるように添加し、65℃にて、16時間保温することにより、ハイブリダイゼーションを行った。続いて、このメンブランを、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む2×SSC溶液(30

0 mM 塩化ナトリウム、30 mM クエン酸三ナトリウム) 中で、65℃にて、30分間洗浄した。この洗浄は二度行った。続いて、これらメンブランのオートラジオグラフィを行うことによって、陽性を示すブランクを検出した。

- 次に、陽性シグナルに対応するブランクを含むブランク群を単離し、1 mlのSM
- 5 緩衝液 (50 mM トリシュー塩酸 (pH 7.5)、100 mM 塩化ナトリウム、10 mM 硫酸マグネシウム、0.01%ゼラチン) に懸濁した。この溶液は4℃にて、16時間保温し、ファージを溶出した後、13000回転、10分間の遠心により、上清にファージを回収した。このファージ溶液を上記と同様の方法でLB-硫酸マグネシウムプレートに散布し、陽性ブランクをスクリーニングした。この結果、
- 10 完全に単離されたブランクとして陽性ブランクを単離する事に成功した。このブランクより上記と同様の方法でファージを単離した。

- 次に、このファージに含まれるライブラリDNAの塩基配列を決定する目的で以下の実験を行った。このライブラリはラムダPSファージを用いて作成されている (Mo Bi Tec社製)。このファージはその塩基配列中にloxPの組み換えサイトを
- 15 有しており、Creリコンビナーゼを有する大腸菌BNN 132株中に導入することによって、ファージからゲノムライブラリ配列を含むベクター部分を切り出すことが出来る。この操作を以下の方法に従って行った。20 μ lのファージ溶液を、200 μ lのBNN 132大腸菌液 (大腸菌株BNN 132を0.2%マルトース、10 mM 硫酸マグネシウムを含むLB培地50 ml中にて、37℃にて、16時間振盪
- 20 培養し、5000回転、5分間の遠心にて回収後、25 mlの10 mM 硫酸マグネシウムに懸濁したもの) と混和し、37℃で30分間保温した。続いて、この混合液をLB-アンピシリンプレート (0.5%イーストエキストラクト、1%ペプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.1 mg/mlアンピシリンナトリウムに1.5%寒天を加えて寒天培地としたもの) に散布し、出現したコロニーより目的のプ
- 25 ラスミドを調製した。プラスミドの調製は、ラボマニュアル遺伝子工学 (丸善刊、村松正實編、1990年) 53-55頁の手順に従って行った。このプラスミド中には約15キロベースのライブラリ遺伝子が含まれていることが明らかとなった。以下pPS/libraryと表記する。

(1-3) p5lプロモーター領域をコードする遺伝子断片の配列決定

次に、pPS/library中のライブラリ遺伝子の塩基配列を一部、自動シーケンサーLONG READIR 4 2 0 0を用いて決定し、p51A mRNAを相補するcDNA配列の一部を含むことを確認した。また、その結果、pPS/libraryを制限酵素EcoRVで切断したときに生じる0.6キロベースの遺伝子断片にp51A mRNAを相補するcDNA配列

5 の一部が含まれることが明らかになった。続いて、pPS/libraryを制限酵素PvuII（東洋紡社製）で切断し、0.8%アガロース電気泳動で分画後、ナイロンメンブレン、HybondN+（アマシャム社製）にブロッティングした。プラスミド断片のブロッティングは、ラボマニュアルヒトゲノムマッピング（丸善刊、堀雅明、中村祐輔編、1991年）26-36頁の手順に従って行った。このメンブランを

10 用いて以下の手順でサザンブロッティングを行った。プローブ用cDNA断片としてpPS/libraryを制限酵素EcoRVを用いて切断し、0.8%アガロース電気泳動で分画後、0.6キロベースの遺伝子断片を切り出し、EASYTRAPにて精製した。この精製cDNAをPrime-It IIを用いて放射性同位体標識し、プローブとした。メンブ

15 ランはサザンブロッティング用ハイブリダイゼーション溶液（10%ドデシル硫酸ナトリウム、7%PEG 8000）中で65℃にて、1時間保温し、プレハイブリダイゼーションとした。続いて、前述のプローブを放射性同位体量にして100万dpm/mlとなるように添加し、65℃にて、16時間保温することにより、ハイブリダイゼーションを行った。続いて、このメンブランを、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む2×SSC溶液中で、65℃にて、30分間洗浄した。この

20 洗浄は二度行った。続いて、これらメンブランのオートラジオグラフィーを行うことによってp51AmRNAの直上流域を含むPvuII切断断片が5.5キロベースの長さであることを明らかにした。続いて、pPS/libraryを制限酵素PvuIIを用いて切断し、0.8%アガロース電気泳動で分画後、5.5キロベースの遺伝子断片を切り出し、EASYTRAPにて精製した。この精製cDNA断片を、pBluescript II SK(+)

25 を制限酵素EcoRVで切断後エピアルカリホスファターゼで脱リン酸化したものと、DNAライゲーションキットを用いて接続した。このプラスミドを以後、pBS/PvuII5.5と表記する。この塩基配列を自動シーケンサーLONG READIR 4 2 0 0を用いて決定した。この塩基配列と、上記で決定したpPS/libraryの部分塩基配列を総合し、配列表の配列番号2に示す塩基配列を得た。また、配列表の

配列番号2に示される塩基配列から、p51の5ダッシュ側非翻訳領域をコードする部分を取り除いた塩基配列を配列表の配列番号1に示した。また、このPvuII切断断片の3ダッシュ末端は、p51mRNAに対応するcDNA配列である配列表の配列番号9の第1番目の塩基の約0.22キロベース上流に存在することが明らかとなった。

そこで、報告されているp51AmRNAの一部に対応するcDNAである配列表の配列番号9の第1番目の塩基までを含むプラスミドを調製することを目的として以下の操作を行った。pPS/libraryを制限酵素EcoRVを用いて切断し、0.8%アガロース電気泳動で分画後、0.6キロベースの遺伝子断片を切り出し、EASYTRAPにて精製したものと、pBS/PvuII5.5を制限酵素EcoRV並びに制限酵素SmaI（宝酒造社製）で切断し、エビアルカリホスファターゼで脱リン酸化したものと、DNAライゲーションキットを用いて接続した。得られたプラスミドを解析し、正しい方向に接続されているプラスミドを単離した。以下、このプラスミドをpBS/p51 promoterと記載する。

また、この塩基配列がゲノム上に確実に存在することを証明する目的で、以下の実験を行った。大腸癌細胞株HCT116株よりゲノムDNAを調製し、これを鋳型にPCRを行った。ゲノムDNAは細胞工学実験プロトコル（秀潤社刊、東京大学医科学研究所制癌研究部編、1993年）16-19頁に準じて調製した。プライマーは配列番号10と11に示したものをを用いた。これは、それぞれ、配列表の配列番号1の塩基配列の第3543番目から第3570番目の塩基のセンス鎖、第5458番目から第5487番目のアンチセンス鎖に相当する。ポリメラーゼはLA Taq（宝酒造社製）、PCRは94℃（1分）、68℃（3分）を1サイクルとして30サイクル増幅した。このPCR産物を0.8%アガロース電気泳動し、1.9キロベースの遺伝子断片が特異的に増幅されることを確認した。さらに、この断片を切り出した後、EASYTRAPにより精製し、pBS/EcoRV TAとDNAライゲーションキットを用いて接続した。このプラスミドの塩基配列を自動シーケンサーLONG READIR 4200を用いて決定し、pBS/p51 promoter中の塩基配列と完全に一致することを確認した。

(1-4) p51プロモーター領域を含むルシフェラーゼベクターの構築

単離した領域にプロモーター活性が存在することを確認する目的で、この遺伝子配列をルシフェラーゼレポーター遺伝子上流に接続したベクターを以下の方法に従って調製した。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有するベクターとして、pGL2 (プロメガ社製) を用いた。まず、哺乳類細胞中にpGL2を組み込み、選択することが可能となるように、このベクターにネオマイシン耐性遺伝子を導入することとした。pGL2を制限酵素BamHI (東洋紡社製) で切断したものと、pMAM neo (東洋紡社製) をBamHIで切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動で分画後、2617ベースのネオマイシン耐性遺伝子を切り出し、EASYTRAPで精製したものとをDNAライゲーションキットを用いて接続した。このプラスミドを以下、pGL2-neoと表記する。続いて、pGL2-neoを制限酵素XhoI (東洋紡社製) で切断後、エタノール沈殿し、さらに70%エタノールで洗浄後、精製水に溶解した。このDNAを、DNAブランディングキット (宝酒造社製) を用いて切断末端を平滑化した後、エタノール沈殿し、70%エタノールで洗浄後、精製水に溶解した。続いて、このDNAを制限酵素KpnI (ベーリンガーマンハイム社製) で切断後、フェノール処理、クロロホルム処理による除蛋白を行い、エタノール沈殿、さらに70%エタノールで洗浄後、滅菌水に溶解した。このDNAをpGL2-neo/XhoI (blunting), KpnIと表記する。

次に、pBS/p51promoterを制限酵素NotI (ベーリンガーマンハイム社製) で切断後、エタノール沈殿し、さらに70%エタノールで洗浄後、精製水に溶解した。このDNAを、DNAブランディングキット (宝酒造社製) を用いて切断末端を平滑化した後、エタノール沈殿し、70%エタノールで洗浄後、精製水に溶解した。続いて、このDNAを制限酵素KpnI (ベーリンガーマンハイム社製) で切断後、0.8%アガロース電気泳動で分画し、5.7キロベースの遺伝子断片を切り出し、EASYTRAPにより精製した。この遺伝子断片をpBS/p51promoter/NotI (blunting), KpnI5.7と表記する。続いて、pGL2-neo/XhoI (blunting), KpnIとpBS/p51promoter/NotI (blunting), KpnI5.7をDNAライゲーションキットを用いて接続した。このプラスミドをpGL2-neo/p51promoterと表記する。また、このプラスミドの遺伝子配列を配列表の配列番号の12に示す。さらに、このプラスミドの制限酵素地図を図1に示す。

(1-5) p51の転写量に対する各種薬剤等の効果

1) ノーザンハイブリダイゼーション

大腸癌由来細胞株HCT 116に薬剤刺激を始めとする様々な刺激を与え、p51の発現量の変化をノーザンブロッティングによって検討した。20万個のHCT 116細胞株を直径60mmの培養ディッシュに散布し、5%二酸化炭素の存在下、37℃にて、2日間培養した。メディウムはMcCoy's 5A (日生研社製)に最終濃度が10%となるようにウシ血清 (FBS: fetal bovine serum) を添加したもの (以下McCoy's 5A/10%FBSと表記する) を用いた。続いて、A23187 (0.1 μ M、1 μ M)、シスプラチン (1 μ g/ml、10 μ g/ml)、CPTcAMP (0.1 μ M、1 μ M)、エトポシド (10 ng/ml、0.1 μ g/ml)、ジェニステイン (1 μ M、10 μ M)、ML-236B (1 μ g/ml、10 μ g/ml)、ミルリノン (1 μ M、10 μ M)、マイトマイシンC (5 μ g/ml、50 μ g/ml)、NKH477 (0.1 μ M、1 μ M)、オカダ酸 (1 nM、10 nM)、ラディシコール (0.1 μ g/ml、1 μ g/ml)、スタウロスポリン (1 nM、10 nM)、タキソール (1 μ g/ml、10 μ g/ml)、トリコスタチンA (0.1 μ g/ml、1 μ g/ml)、放射線照射 (一平方メートルあたり50 J、100 J)、ビタミンD3 (10 nM、100 nM)、ビンクリスチン (1 μ g/ml、10 μ g/ml)、ワートマニン (0.1 μ M、1 μ M) を処理し、5%二酸化炭素の存在下、37℃にて、24時間さらに培養した。続いて、この細胞より、ISOGEN (ニッポンジーン社製) を用いてRNAを調製した。RNAは各20 μ gをホルムアルデヒドを含む1%アガロース電気泳動にて分画し、前記の新細胞工学実験プロトコール194-197頁の方法に従ってナイロンメンブランHybondN+にブロッティングした。プローブとして、pBS/p51AORFを制限酵素EcoRI (東洋紡社製) で切断し、0.8%アガロース電気泳動で分画後、0.6キロベースの遺伝子断片を切り出し、EASYTRAPにより精製したものを、Prime-It IIにて放射性同位体標識したものをを用いた。メンブランを10mlのプレハイブリダイゼーション溶液 (25 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、6 \times SSC、50%ホルムアミド、5 \times デンハルト溶液、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、0.2 mg/ml サケ精子DNA) 中で42℃にて、4時間保温し、プレハイブリダイゼーションとした。続いて、10mlのハイブリダイゼーション溶液 (20 mM リン酸緩

衝液 (pH 7.0)、6×SSC、50%ホルムアミド、1×デンハルト溶液、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、0.1mg/mlサケ精子DNA、4%デキストラン硫酸)に置換した後、放射性同位体標識した上記プローブを100万dpm/mlになるように添加し、さらに42℃にて、16時間保温することにより、ハイブリダイゼーションを行った。次にこれを、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む2×SSC中で、65℃にて、30分間洗浄した。この洗浄は二度行った。このメンブランをオートラジオグラフィーにより解析した。

2) 結果

この結果、1μg/mlのトリコスタチンA処理細胞にのみp51A由来のcDNAと反応する特異的なバンドが認められた。その他のいずれの刺激においてもp51mRNA量の増加は認められなかった。図2に、トリコスタチン処理によるp51mRNAの上昇を示す。なお、図2においては、レーン1、2：タキソール (1μg/ml、10μg/ml) 処理細胞、レーン3、4：トリコスタチンA (0.1μg/ml、1μg/ml) 処理細胞、レーン5、6：放射線照射 (一平方メートル当たり50J、100J) 処理細胞、レーン7、8：ビタミンD3 (10nM、100nM) 処理細胞、レーン9、10：ビンクリスチン (1μg/ml、10μg/ml) 処理細胞、レーン11、12：ワートマニン (0.1μM、1μM) 処理細胞のRNA20μgのプロットを示した。

(1-6) p51プロモーター領域の機能解析

引き続き、p51プロモーター領域の機能解析を行う目的で以下の実験を行った。20万個のHCT116細胞を直径60mmの培養ディッシュに散布した。メディウムはMcCoy's 5A/10%FBSを用いた。これらを、5%二酸化炭素の存在下、37℃にて、48時間培養した後、メディウムを血清を含まないMcCoy's 5Aに置換した。続いて、pGL2-neo/p51promoter又は、pGL2-neo ベクター各2μgを導入した。プラスミドの導入は、リポフェクトアミンプラス試薬 (GIBCO BRL社製) を用いて行った。すなわち、プラスミド溶液に125μlのMcCoy's5Aと、8μlのプラス溶液を加え、良く攪拌した後、室温にて15分間保温した。ここに、125μlのMcCoy's5Aと12μlのリポフェクタミン溶液を添加し、良く攪拌した後、室温にて、さらに15分間保温した。これを上記の手順で培養したHCT116細

- 胞に投与し、穏やかに混和後、5%二酸化炭素の存在下、37℃にて、3時間培養しプラスミドを取り込ませた。続いてメディウムをMcCoy's 5A/10%FBSに置換し、5%二酸化炭素の存在下、37℃にて、21時間培養した。引き続いて、この二群の細胞にトリコスタチンAを最終濃度0又は1 $\mu\text{g/ml}$ になるように投与し、5%二酸化炭素の存在下、37℃にて、24時間培養した。これらの細胞について、そのルシフェラーゼ活性を測定することによって、プロモーター活性の検討を行った。また、ルシフェラーゼ遺伝子を含まないネガティブコントロール細胞として、pcDNA3/lacZ (lacZ遺伝子を哺乳類細胞発現ベクターpcDNA3に接続したもの)を上記と同じ手順でトランスフェクションしたものを準備した。ルシフェラーゼ活性測定は以下の方法に従って行った。

- 細胞培養ディッシュ中のメディウムを除去し、5mlの細胞溶解試薬 (25mM トリスー塩酸 (pH7.8)、2mM ジチオトレイトール、2mM CDTA、0.2% トライトンX-100、10%グリセロール)を添加した後、室温にて15分間保温した。この細胞溶解液を10、20、30、40、50 μl ずつ分取し、基質液 (20mM トリシンー水酸化ナトリウム (pH7.8)、1.07mM 塩基性炭酸マグネシウム、2.67mM 硫酸マグネシウム、0.1mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、33.3mM ジチオトレイトール、270 μM コエンザイムA、470 μM ルシフェリン、530 μM アデノシン三リン酸) 50 μl を添加し、室温にて15秒保温した後、ルミノメーターLUMINOSKAN (大日本製薬社製)にてその化学発光強度を測定した。これらの結果を図3に示す。

これらの結果より、pGL2-neo/p51promoter導入細胞溶解液はpGL2-neoに比べて有意に高い蛍光強度を示すことがわかった。また、トリコスタチンAの投与によってpGL2-neo/p51promoter中の化学発光強度はさらに著しく増強された。この結果は、前述の図2の結果と一致するものである。

- 上記の実験データから、単離した遺伝子断片が機能的なp51プロモーター領域であることが明らかとなった。

実施例2

p51プロモーター機能を修飾する薬剤のスクリーニング

(2-1) スクリーニング用培養細胞株の調製

pGL2-neo/p51promoterプラスミドを保持する培養細胞株はp51プロモーター機能を修飾する薬剤のスクリーニング用細胞として利用可能である。該薬剤は癌を始めとする様々な疾患の治療に有効である。該細胞を以下の手順で調製した。

- プラスミド導入細胞として、HCT 1 1 6 細胞株を用いた。5 0 万個のHCT 1 1 6
- 5 細胞を直径 6 0 mm の培養ディッシュに散布した。メディウムはMcCoy's 5A/10%FBS を用いた。これらを、5 %二酸化炭素の存在下、3 7 度にて、4 8 時間培養した後、メディウムを血清を含まないMcCoy's 5Aに置換した。導入用プラスミドとして、pGL2-neo/p51promoter 2 μ g を 4 μ l のTE溶液に溶解し、プラスミド溶液とした。プラスミドの導入は、リポフェクトアミンプラス試薬 (GIBCO BRL社製) を
- 10 用いて行った。すなわち、プラスミド溶液に 1 2 5 μ l のMcCoy's 5Aと、8 μ l のプラス溶液を加え、良く攪拌した後、室温にて 1 5 分間保温した。ここに、1 2 5 μ l のMcCoy's 5Aと 1 2 μ l のリポフェクタミン溶液を添加し、良く攪拌した後、室温にて、さらに 1 5 分間保温した。これを上記の手順で培養したHCT 1 1 6 細胞に投与し、穏やかに混和後、5 %二酸化炭素の存在下、3 7 度にて、3 時間培
- 15 養しプラスミドを取り込ませた。続いてメディウムをMcCoy's 5A/1 0 %FBSに置換し、5 %二酸化炭素の存在下、3 7 度にて、2 1 時間培養した。この細胞を、0. 2 5 %トリプシン、0. 0 2 %EDTAを含むPBSによって培養ディッシュより回収し、その 1 %量を直径 1 0 0 mm の培養ディッシュに散布した。McCoy's 5A/10%FBSメディウム中、5 %二酸化炭素の存在下、3 7 度にて、さらに 7 2 時
- 20 間培養した後、選択用薬剤として 1. 2 mg/ml のジェネティシン (ナカライテスク社製) を添加した。培地を 3 日おきに交換しつつ、上記条件にてさらに 2 週間培養することによって、プラスミド遺伝子が細胞内遺伝子中に導入され、ジェネティシン耐性となった細胞を選択した。続いて、ディッシュ上でコロニーを形成した細胞群を 5 0 クローン単離し、2 4 穴の培養ディッシュに散布し、培養を継
- 25 続した。

これらクローンは、p51プロモーター機能を活性化するような刺激に対して、ルシフェラーゼ活性の増大を示すことが期待できる。そこで、次にこれらクローンのトリコスタチンAに対する反応性を以下の手順により検討した。各クローン化細胞 5 0 万個ずつを直径 6 0 mm の培養ディッシュに散布した。メディウムは

McCoy's5A/10%FBSを用いた。これらを、5%二酸化炭素の存在下、37度にて、48時間培養した後、この二群の細胞にトリコスタチンAを最終濃度0又は0.1 $\mu\text{g/ml}$ になるように投与し、5%二酸化炭素の存在下、37度にて、24時間培養した。これらの細胞について、そのルシフェラーゼ活性を測定することによって、p51プロモーター活性に与える影響を検討した。ルシフェラーゼ活性測定は上記の方法に従って行った。その結果、0.1 $\mu\text{g/ml}$ トリコスタチンAに対して有意にルシフェラーゼ活性の上昇を示すクローンが複数個得られ、その中からスクリーニング用細胞として、HCT 116/p51 promoter clone#9を選択した。ルシフェラーゼアッセイの結果を表1に示す。

10

表 1

Clone No.	# 5	# 9	# 17	# 18
Without TsA	3.9	1.0	17.0	6.8
With TsA	29.5	33.3	44.1	14.0

表中、TsAはトリコスタチンAを示す。トリコスタチンA投与群は0.1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で投与した。図の値はルシフェラーゼ活性の測定値を示す。

15 (2-2) p51プロモーター機能を修飾する薬剤のスクリーニング

HCT 116/p51 promoter clone#9培養細胞株は、p51プロモーター機能の活性化を誘導する薬剤のスクリーニングに有用である。該スクリーニングを以下の手順で行った。

1万個のHCT 116/p51 promoter clone#9培養細胞株を96穴の培養ディッシュに散布し、200 μl のRPMI1640/10%FBS中で、5%二酸化炭素の存在下、37度にて、24時間培養した。続いて、スクリーニング用の薬剤を添加し、24時間培養を継続した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。薬剤として、合成化合物、もしくは微生物二次代謝産物を用いた。

1200点の化合物、ならびに9600点の微生物二次代謝産物をスクリーニングし、0.1 $\mu\text{g/ml}$ トリコスタチンAと同等以上のp51プロモーター活性化能を示すサンプルを71点得た。p51プロモーターを活性化する物質は、癌を始めとする様々な疾患の治療剤となると期待される。

産業上の利用可能性

本発明により、細胞死誘導能を示す蛋白質p51のプロモーター領域をコードする遺伝子、並びにp51の5ダッシュ非翻訳領域をコードする遺伝子が提供される。これらは、細胞増殖制御の異常で起こる癌を始めとする疾患の診断、治療に有用である。さらに本発明により、これら遺伝子のアンチセンスDNA及びアンチセンスRNA、これら遺伝子の一部又は全部からなる核酸プローブ、その核酸プローブを用いた上記本発明遺伝子あるいはその類似遺伝子の検出方法、上記本発明遺伝子を導入させた形質転換体、これらを用いた薬剤のスクリーニング法などが提供される。これら遺伝子は癌等の疾患の診断、治療にも有用である。

10 配列表フリーテキスト

配列表の配列番号：5から8、10及び11の塩基配列は、PCRプライマーを示す。

配列番号：9の塩基配列は、p51AmRNAの5ダッシュ末端非翻訳領域及びp51AmRNAのオープンリーディングフレームの5ダッシュ末端側165ベースをコードする。

配列番号：12の塩基配列は、p51のプロモーター及びネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドのDNA配列を示す。

請 求 の 範 囲

1. 以下の(1)、(2)、(3)、(4)、(5)又は(6)に示すp51プロモーター領域をコードする遺伝子：

- 5 (1) 配列表の配列番号：1に示す塩基配列を有するp51プロモーター領域をコードするDNA；
- (2) 配列表の配列番号：1に示す塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター能を有するDNA；
- 10 (3) 配列表の配列番号：1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター能を有するDNA；
- (4) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列を有する、p51プロモーター領域及びp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードするDNA；
- (5) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列において1もしくは複数個の塩基
- 15 が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を有し、かつp51プロモーター能を有するDNA；
- (6) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつp51プロモーター能を有するDNA。

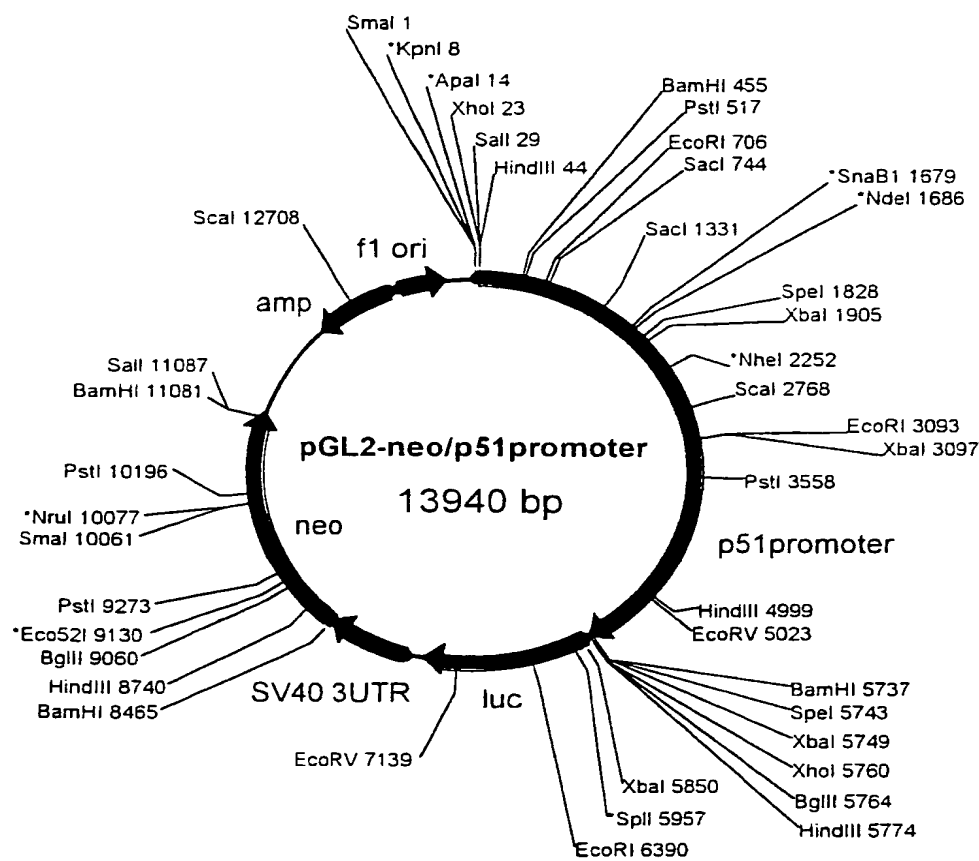
20 2. 以下の(7)、(8)又は(9)に示すp51の5ダッシュ末端側非翻訳領域をコードする遺伝子：

- (7) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5 6 7 7番目から5 9 6 0番目の塩基配列を有するDNA；
- (8) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5 6 7 7番目から5 9 6 0番目の塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換もしくは
- 25 付加された塩基配列を有し、かつ上記(7)のDNAと同様の機能を有するDNA；
- (9) 配列表の配列番号：2に示す塩基配列における5 6 7 7番目から5 9 6 0番目の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ上記(7)のDNAと同様の機能を有するDNA。

3. 請求項 1 の遺伝子を含むことを特徴とする組換え体プラスミド。
4. 請求項 3 の組換え体プラスミドを含む形質転換体又は形質導入体。
5. 請求項 1 又は 2 の遺伝子の全部又は部分からなる核酸プローブ。
6. 請求項 5 の核酸プローブを用いることを特徴とする p51 プロモーター領域、
- 5 またはその類似遺伝子のクローニング方法。
 7. 請求項 1 又は 2 の遺伝子の全体又は部分に対してアンチセンスであり、p51 遺伝子の発現を上昇あるいは阻害する DNA 配列。
 8. 請求項 1 又は 2 の遺伝子の全体又は部分に対してアンチセンスであり、p51 遺伝子の発現を上昇あるいは阻害する RNA 配列。
- 10 9. 請求項 4 の形質転換体又は形質導入体を用いた p51 プロモーターに作用する薬剤のスクリーニング方法。
 10. 請求項 9 のスクリーニング方法により選択された、p51 遺伝子の発現を上昇あるいは阻害する化合物。
 11. 請求項 1 の DNA 配列、請求項 7 の DNA 配列、又は請求項 8 の RNA 配列を含む
- 15 ことを特徴とする医薬製剤。

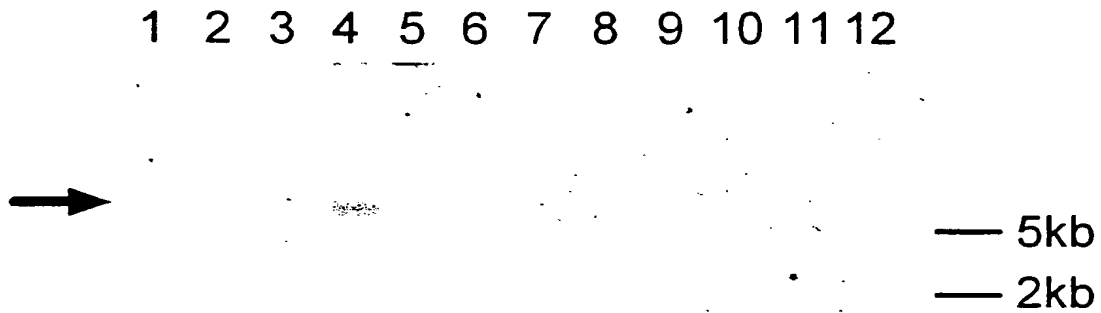
1 / 3

FIG. 1



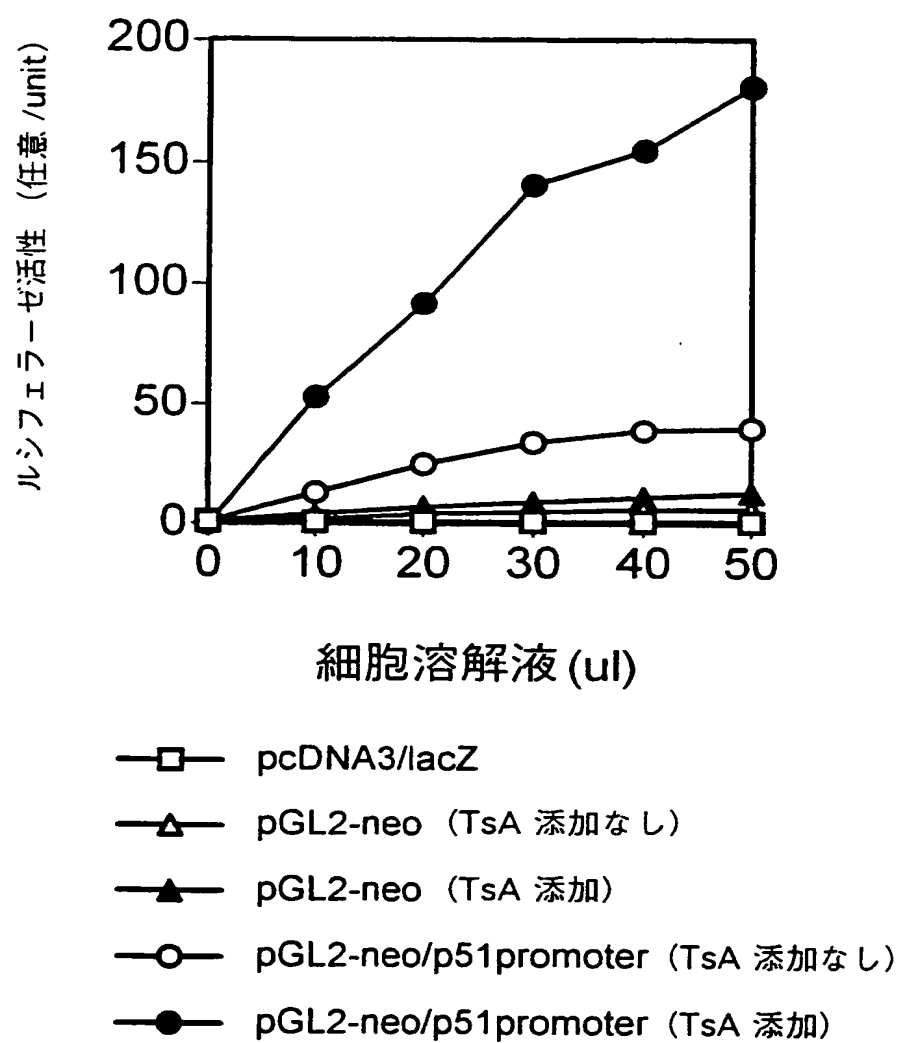
2 / 3

FIG. 2



3 / 3

FIG. 3



配列表
SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON KAYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Gene Encoding Promoter Region of Tumor Suppressor Gene p51

<130> E5295-00

<150> JP 11-183195

<151> 1999-6-29

<160> 12

<210> 1

<211> 5 6 7 6

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cagctgttca gggatgtctg gaaaagaagc ccacccacat tgcttctgga cactgggtgt	60
gactttggag ggtatcaggt ttgtctgtta aagaaactgc caacctcttc ctgccccaat	120
tggcctctgt tcccttgcac gccctctttc cttgggacac tcccttaagg catcttcttg	180
acattaactt aactataaat gtttatttga tgaatttcag tgacctgaag agagatggag	240
gtcaaatacag aagaagcaca tggctaaggt tgcaatgcac ttgctttttc attgaattaa	300
agtcattcga ataccattca gtttacttaa gttctaggcc cagctttact cctaatacat	360
gtcagactgt agcaaataatt aggtccaaag ttggaagagt tagcaggatc ctctccatga	420
cagaactttg gcttccactt tactaaaata gagattgtgt ggttgagctg cagctatgta	480
cagaaaagtg tcatacaatt aaaaatcacc aaactcagtc tcttcaattt gagcaatagt	540

tggtgaattt actccaccac ctctctctct tgaaggttct ttcttgctct cctcactata 600
aatgcaggat gacctggaaa ggctaggacc tgaggttcag ttacctgac acaaaggaat 660
tcagtttctc tgatctcata gtcacaggct gccagagctc tacggaacat gcaagatcat 720
ctgctttaag cctcttggtg tggcatctgt tgttttccac tgccctgtac ctattgctct 780
ttccttggtt aacagaacct ttattttctt ctgaaaactc tctgctcagt catggtaggg 840
ccatcagtc acatgatcag gcctctcctg gccaaacatg gcacttttct tttgggaatt 900
tgaatcttaa gctgaatagc tgaagttcaa aaaaagctgt tgaatctgac ttacgcctac 960
agtggctttg caaagtgact gtccattcct atttcttaag tccctgaatt tataatttat 1020
cctgggttaca gccctttctg agatgtgtgg ttttttttcc aactgtctct tatagtctgt 1080
gaattttcat atttcttttc atacattttc atgttttggt tgtttgtttg tgtgtttttt 1140
ggcttttaggt aggcagaatc agtttctggt gtttataccc aaggaatcct gattgataca 1200
tccttcccct ttaaaaataa agtatctaag gctcaaagag agtaggctac ctgcctgagg 1260
tctgggagta agttagtacc agagctcgta ctaaccccag gttagccaac tgctttacac 1320
aacatttgct ctctccttca gagttatagc agtcttgga gaaagaagct actattttgc 1380
caaagacctc aggaggacca agaacaagtt ctgggatatg tgatgattga actcttaaaa 1440
agtttggttg acttctggcc ataattgtgt atctaagacc agatttcatt cttaatagct 1500
aaacaaacaa acaagagatc cacaggttca gcagctataa taagagtga ttactgatac 1560
agttgacaac atgaatatat ctacagaaacc atggcatcaa tgagcaaaaa aaatccagac 1620
acagaagaat acgtaccata tgccctgcatt tatgtgatat tctagcattg tattgtccaa 1680
catagtagcc agtagcctca catggctatt caaattttaag ttgattaaaa ttaagtaaga 1740
ataaaaattt agctcttcag tagcgttagc cacatgtaac tagtggctac cacatcagac 1800
ggtgcaaata tagaatattt cctttataac agaaagttct attggaaaac aatgttctag 1860
aaaatataca cataatctat aaaaacaaaa agcaagtcag tgattgtcta aggccagggg 1920
tgaggggaga tcgattgcaa agtgggtatga ggaaagtttt ggggtaatag ggttggttga 1980
atcttgattg cgatgaaggc tactcggtgt ctaatgtgtc acctcctcag actgaacact 2040
tggaattggc gaatttcatt gtatgtaaat tatacctcat aaagtaactc taagaggtca 2100
agtgttttgt ggaaattatt tttaatcagt tgcaatactt attatgagat gatttttgca 2160
aatacataaa catgttattc atccattagg tgcaatattt ttgctagctc ctgaaaacac 2220
agagatgaat tagaatagca agcctgcctt caagctgttc acaatccagt acaggagatg 2280

agtctattca aaaatagcta gactccagga agaaagttaa aggtgacctt acacaaaaaa 2340
gtgcagatat aattatgtag gacagtagaa gtggggaagg tttcttttat gtggaaaaaa 2400
gagggagaat ttttggtctt tgaaggatga gcaagatgtg aataatgcgca gatggagttt 2460
taaaacattc ctgggtggagg gcagaatatg atccaaggca caagagcaac cagaaaaata 2520
tgcaacctag aggaaagtgc atgaagggga gcagttgtaa aataattttc atgaatgtaa 2580
gtgagaagaa tttgtatcat agacacctga gtttggcaga gtgcatgttc ttggctccta 2640
ggagtcaaga agaacaaagt gtccctttct cctacgttat gctcagtggt ccaagtccaa 2700
aacacctttc ctcccttaag tactttcttc tcccctccat acaaattctaa agtcttcaca 2760
aacatcattt aaacaggcag gtcattggtca gaaaggcaat tgcttttcct agacttctat 2820
gtacgttatt atattacaat ttctgcctaa aagactctaa agtcttggaa aagtttccac 2880
cttgcacatc aaagatataa ttcatgcatt tgtatagtaa ccttagtccc ctaagagaat 2940
aaggatgaac tataaatata agaagtaatt atggtaatta taataatgatt gccacttatt 3000
tttcaattga tcgtgtatgg ttgcatgcta ctgggtgttct gttgaattct agagagtttg 3060
cctctttttc ctgggtcaac tctcgccatt tatttccata atgcaatagg agccaatctt 3120
tttcataatt acttatttaa aatttgttgc catttaattt ctgttccctt tagcttagta 3180
actttaggat ttttaaataa caactattga aatcatgaca tacgttttaa tgatattatt 3240
taaatacgtt aggctataaa ccttttaaat tttttaaaaa aatagatgag tgtgggtggct 3300
catgcctgta atcccaacac ttgggaagc cgggtcggga ggatagcttg agtccagcag 3360
tttgagacca gtcagggcaa cacagcaaga ccccatatct aaaaaaacia aacaaaacia 3420
aattacctgg gtatggttgt gctcacctgt agtccaagct acacaggaag ctgaggcaga 3480
aggatcactt gagcccagga ggttgaggct gcagtgatcc atgaacgcgc tgctacactc 3540
agtctgggtg acagtgaag aagctgtctc aaaaataata aataaataaa aataactttt 3600
aaaaaaciaa aattaattaa attttaaaaa cacaacacac tagagatgtt tgcaattga 3660
ttatttggga gtctatatcc ctggaagtta atttaaaata tttagaagag ttcttcctca 3720
tttcctagag acgtcgaatt glaaatatca gagctagaag gaacactagg gctcgccact 3780
ccaaagtgtg gtccaaggac cagcagcatc aagtaacctg ggaacgtgtt agaatgcag 3840
agtcttaggc ctacccccag acctactgaa ccagaatctg caltaacaag atttctaggt 3900
gcctcacggg cacattaaaa cttgagaagc tctgcactag aaalcctcac tccacctttc 3960
attataaatg gaatcacttg ggctgtggtc acaggaaatt gattattttt aatttcagaa 4020

ccttctatatt aggtcatcta tatttgctaa tagcagggaa gaaagccaaa ctctttaact 4080
gcaattaaca aatctataat taattagtta agcaatcttc cctttaagtt ttacattttg 4140
tggagcaagc tgtttgatit ggctggggct caggccggcc tgtttgtgaa tttcacaatt 4200
cacagatggt agccgctctc gggctaagta aaggaagaga atgtcaagtt ttaaatagct 4260
tctcccttcc atcctggctg aagcaacaaa taaaataatt ttatgaaaca cattttgagt 4320
tagatttact tacagggaaa tgtcaaattt ctctgaaagg gcttttagatt gtctcacaac 4380
tttgacatct actgatgtca cctatttaca ggtgtgtcct gtgactaggg ggtgaaggga 4440
agatgtgaac tcaccatggt agtgaccgtt agatacacag agtggttttt tttccccctg 4500
ttggagtcta tcctaactga gcttctgaat catatttcat tcaatttcca aatccacaaa 4560
accaggataa gtttacagcc catattcaga aaggaaataa attattttgt gtgtagactt 4620
tcctgatatt aactgatit gggaatatat gaacaatttt atggtttctt ttcgaagtag 4680
gtcaagtcaa agcaaaacca aaaacagcaa aaactgtaag acataaagaa tagagtggag 4740
ccgactgaga gattaaaata aactagaata tttttattaa caggcaattt gaaataattt 4800
gtgcacttca gaatattcta caataatata ttatttccaa ttttaatatc ttttaagaaaa 4860
ttactatatt atatgtaagt acatgtgcat gtgtttgagg taggatattt aactcaataa 4920
aggttatttt cttttattcg ggtcaggcaa agcttctaag gggatgtgaa agggatatct 4980
ctttctctta gctgagagga agagtgagtt ctaagttaaa tataatcaag gaatttccct 5040
gtctttgcta tttgagattg tgaccacaac aggcggttgg ctgaaaggga aactgaaggg 5100
cggggaggga gggaaataga tgaaaaaaca aaacaaaaca aaacttccct aagcagctct 5160
acaaaacatt ttagccccag aaatagtcac agaaatcctc aatcaaacc agtatccaga 5220
tacaaggaag tgttatgtag ctggagcagg gtggacactc atcagctcag ttcagttaca 5280
aaagtccagg ctgctgaaat taaactctga tgccattcat gccagcatcc aatcacgaca 5340
gagatcagaa gttcagagat gctccagct ccaaattgcc aacaacaagt gtggctacta 5400
tacgtcaagg actctgaagc cgtgagagag ggggaagaac aacagtagag aggatgccca 5460
gctggtaaga atcgagtgtt tatgaagttt tagtcaattg atgaatctca ttggctaaaa 5520
tcaagaaaag ctccgcctct ttgcaaatat gtatgaagga gagaaagtcc taaacttcta 5580
tgtctgatag catttgacct tattgctttt agccctcccg ctttatatct atatatacac 5640
aggtatttgt gtatatttta taaatigtgt ctcctt 5676

<210> 2

<211> 5 9 6 0

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> promoter

<222> (1)...(5 6 7 6)

<221> 5'UTR and intron

<222> (5 6 7 7)...(5 9 6 0)

<400> 2

cagctgttca gggatgtctg gaaaagaagc ccacccacat tgcttctgga cactgggtgt	60
gactttggag ggtatcaggt ttgtctgtta aagaaactgc caacctcttc ctgcccgaat	120
tggcctctgt tcccttgcac gccctcttcc cttgggacac tcccttaagg catcttcttg	180
acattaactt aactataaat gtttatttga tgaatttcag tgacctgaag agagatggag	240
gtcaaactcag aagaagcaca tggctaaggt tgcaatgcac ttgcttttcc attgaattaa	300
agtcattcga ataccattca gtttacttaa gttctaggcc cagctttact cctaactgat	360
gtcagactgt agcaaataat aggtccaaag ttggaagagt tagcaggatc ctctccatga	420
cagaactttg gcttccactt tactaaaata gagatttgtt ggttgagctg cagctatgta	480
cagaaaagtg tcatacaatt aaaaatcacc aaactcagtc tcttcaattt gagcaatagt	540
tgggtgaattt actccaccac ctctctctct tgaagggttct ttcttgctct cctcactata	600
aatgcaggat gacctggaaa ggctaggacc tgagggttcag ttacctgac acaaaggaat	660
tcagtttctc tgatctcata gtcacaggct gccagagctc tacggaacat gcaagatcat	720
ctgctttaag cctcttgttg tggcatctgt tgttttccac tgccctgtac ctattgctct	780
ttccttggtt aacagaacct ttattttctt ctgaaaactc tctgctcagt catggtaggg	840
ccatcagtc acatgatcag gcctctcttg gccaaacatg gcctcttctt tttgggaatt	900
tgaatcttaa gctgaatagc tgaagttcaa aaaaagctgt tgaactgac ttacgcctac	960
agtggctttg caaagtgact gtccattcct atttcttaag tccctgaatt tataatttat	1020

cctggttaca gccctttctg agatgtgtgg ttttttttcc aactgtctct tatagtctgt 1080
gaattttcat atttcttttc atacattttc atgttttgtt tgtttgttg tgtgtttttt 1140
ggcttttaggt aggcagaatc agtttctgtt gtttataccc aaggaaacct gattgataca 1200
tccttccctt ttaaaaataa agtatctaag gctcaaagag agtaggctac ctgcctgagg 1260
tctgggagta agttagtacc agagctcgta ctaaccccag gttagccaac tgctttacac 1320
aacatttgc tctctcttca gagttatagc agtcttggaa gaaagaagct actattttgc 1380
caaagacctc aggaggacca agaacaagtt ctgggatatg tgatgatga actcttaaaa 1440
agtttgttgg acttctggcc ataatttgtt atctaagacc agatttcatt cttaatagct 1500
aaacaaacaa acaagagatc cacaggttca gcagctataa taagagtga ttactgatac 1560
agttgacaac atgaatatat ctgagaaacc atggcatcaa tgagcaaaaa aaatccagac 1620
acagaagaat acgtaccata tgccctgcatt tatgtgatat tctagcattg tattgtccaa 1680
catagtagcc agtagcctca catggctatt caaatttaag ttgattaaaa ttaagtaaga 1740
ataaaaaattt agctcttcag tagcgttagc cacatgtaac tagtggtctac cacatcagac 1800
ggtgcaaata tagaatattt cctttataac agaaagtctt attggaaaac aatgttctag 1860
aaaatataca cataatctat aaaaacaaaa agcaagtcag tgattgtcta aggccagggg 1920
tgaggggaga tcgattgcaa agtgggtatga ggaaagtttt ggggtaatag ggttgttggg 1980
atcttgattg cgatgaaggc tactcggtgt ctaatgtgtc acctctcag actgaacact 2040
tggaattggc gaatttcatt gtatgtaaat tatacctcat aaagtaactc taagagggtca 2100
agtgttttgt ggaaattatt tttaatcagt tgcaatactt attatgagat gatttttgca 2160
aatacataaa catgttattc atccattagg tgcaataatt ttgctagctc ctgaaaacac 2220
agagatgaat tagaatagca agcctgccct caagctgttc acaatccagt acaggagatg 2280
agtctattca aaaatagcta gactccagga agaaagttat aggtgacctt acacaaaaaa 2340
gtgcagatat aattatgtag gacagtagaa gtggggaagg tttcttttat gtggaaaaaa 2400
gagggagaat ttttggctct tgaaggatga gcaagatgtg aatatgagca gatggagttt 2460
taaaacattc ctggtggagg gcagaatatg atccaaggca caagagcaac cagaaaaata 2520
tgcaacclag aggaaagtgc atgaagggga gcagttgtaa aataattttc atgaatgtaa 2580
gtgagaagaa tttgtatcat agacacctga gtttggcaga gtcagtgtc ttggctccta 2640
ggagtcaaga agaacaaggt gtccctttct cctacgttat gctcaatggg ccaagtccaa 2700
aacaccttct cttctttaag taccttcttc tcccctccat acaaatctaa agtcttcaca 2760

aacatcattt aaacaggcag gtcatgggtca gaaaggcaat tgcttttccct agactttctat 2820
gtacgttatt atattacaat ttctgcctaa aagactctaa agtcttggaa aagtttccac 2880
cttgcacatc aaagatataa ttcatgcatt tgtatagtaa ccttagtccc ctaagagaat 2940
aaggatgaac tataaatata agaagtaatt atggtaatta taataatgatt gccacttatt 3000
tttcaactga tcgtgtatgg ttgcatgcta ctgggtgttct gttgaattct agagagtttg 3060
cctctttttc ctgggtcaac tctcgccatt tatttccata atgcaatagg agccaatctt 3120
tttcataatt acttatttaa aatttgttgc catttaattt ctgttccctct tagcttagta 3180
actttaggat ttttaaataa caactattga aatcatgaca tacgtttaaa tgatattatt 3240
taaatacgtt aggctataaa ctttttaaat tttttaaaaa aatagaatgag tgtgggtggct 3300
catgcctgta atcccaacac ttggggaagc cgggtcggga ggatagcttg agtccagcag 3360
tttgagacca gtcagggcaa cacagcaaga ccccatatct aaaaaaaca aacaaaaca 3420
aattacctgg gtatggttgt gctcacctgt agtccaagct acacaggaag ctgaggcaga 3480
aggatcactt gagcccagga ggttgaggct gcagtgatcc atgaacgcgc tgctacactc 3540
agtctgggtg acagtgaag aagctgtctc aaaaataata aataaataaa aataactttt 3600
aaaaaaca aaattaattaa attttaaaaa cacaacacac tagagatgtt tgcaaatgta 3660
ttatttggga gtctatatcc ctggaagtta atttaaaata tttagaagag ttcttccctca 3720
tttcctagag acgtcgaatt gtaaatatca gagctagaag gaacactagg gctcgccact 3780
ccaaagtgtg gtccaaggac cagcagcatc aagtaacctg ggaacgtgtt agaaatgcag 3840
agtcttaggc ctcaccccag acctactgaa ccagaatctg cattaacaag atttctaggt 3900
gctcacggg cacattaaaa cttgagaagc tctgcactag aaatcttcac tccacctttc 3960
attataaatg gaatcacttg ggctgtggtc acaggaaatt gattattttt aatttcagaa 4020
ccttctattt aggtcatcta tatttgctaa tagcaggga gaaagccaaa ctctttaact 4080
gcaattaaca aatctataat taattagtta agcaatcttc cttttaagtt ttacattttg 4140
tgagagcaagc tgtttgattt ggctggggct caggccggcc tgtttgtgaa tttcacaatt 4200
cacagatgtt agccgctctc gggctaagta aaggaagaga atgtcaagtt ttaaataagct 4260
tctcccttcc atcctggctg aagcaacaaa taaaatattt ttatgaaaca cattttgagt 4320
tagatttact tacaggga aa tgtcaaatct ccttgaaagg gctttagatt gtctcacaac 4380
tttgacatct actgatgtca cclatttaca ggtgtgtcct gtgactaggg ggtgaaggga 4440
agatgtgaac tcaccatgtt agtgaccgtt agatacacag agtggttttt tttccccctg 4500

ttggagtcta tcctaactga gcttctgaat cataatttcat tcaatttcca aatccacaaa 4560
accaggataa gtttacagcc cataattcaga aaggaaataa attattttgt gtgtagactt 4620
tcctgataat acactgattt gggaatatat gaacaatttt atggtttcc ttcgaagtag 4680
gtcaagtcaa agcaaaacca aaaacagcaa aaactgtaag acataaagaa tagagtggag 4740
ccgactgaga gattaaaata aactagaata tttttattaa caggcaattt gaaataattt 4800
gtgcacttca gaatattcta caataatata ttattttccaa ttttaatatc ttttaagaaaa 4860
ttactatatt atatgtaagt acatgtgcat gtgtttgagg taggatattt aactcaataa 4920
aggttatttt cttttattcg ggtcaggcaa agcttctaag gggatgtgaa agggatatct 4980
ctttctctta gctgagagga agagtgagtt ctaagttaaa tataatcaag gaatttcctt 5040
gtctttgcta ttgagattg tgaccacaac aggcgggttg ctgaaaggga aactgaaggg 5100
cggggaggga gggaaataga tgaaaaaaca aaacaaaaca aaacttcctt aagcagctct 5160
acaaaacatt ttagccccag aaatagtcac agaaatcctc aaatcaaacc agtatccaga 5220
tacaaggaag tgttatgtag ctggagcagg gtggacactc atcagctcag ttcagttaca 5280
aaagtccagg ctgctgaaat taaactctga tgccattcat gccagcatcc aatcacgaca 5340
gagatcagaa gttcagagat gcctccagct ccaaattgcc aacaacaagt gtggctacta 5400
tacgtcaagg actctgaagc cgtgagagag ggggaagaac aacagtagag aggatgcca 5460
gctggtaaga atcgagtgtt tatgaagttt tagtcaattg atgaatctca ttggctaaaa 5520
tcaagaaacg ctccgcctct ttgcaaatat gtatgaagga gagaagtgcc taaacttcta 5580
tgtctgatag catttgaccc tattgctttt agcctcccgg ctttatatct atatatacac 5640
aggtatttgt gtataattta tataattgtt ctccgttcgt tgataatcaa gacagttgaa 5700
ggaaatgaat ttgaaactt cacggtgtgc caccctacag tactgccctg acccttacat 5760
ccagcggiga gtttgaatgt gacataactt ctctcaaaac ttaattgaag tgccttgtgt 5820
attatgaatg tgcagctgt gtacaaagaa caattcctcc ttgtttagtc agcacagtga 5880
tattattttg gactttctgt ggacttaaag tggctctgtg acataatttc tgaatgtctt 5940
ttttggttga tatttggatc 5960

<210> 3

<211> 5 6 7 6

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

acggagaaca attatataaa atatacacia atacctgtgt atatatagat ataaagccgg	60
gaggctaaaa gcaatagggt caaatgctat cagacataga agtttaggca cttctctcct	120
tcatacatat ttgcaaagag gcggagcggt tcttgatttt agccaatgag attcatcaat	180
tgactaaaac ttcataaaca ctcgattctt accagctggg catcctctct actgttggtc	240
ttccccctct ctacaggctt cagagtcctt gacgtatagt agccacactt gttgttgga	300
atttgagct ggaggcatct ctgaacttct gatctctgtc gtgattggat gctggcatga	360
atggcatcag agtttaattt cagcagcctg gacttttgta actgaactga gctgatgagt	420
gtccaccctg ctccagctac ataacacttc cttgtatctg gatactgggt tgatttgagg	480
atttctgtga ctatttctgg ggctaaaatg ttttgtagag ctgcttaggg aagttttgtt	540
ttgttttggt ttttcatcta ttccctccc tccccgccct tcagtttccc tttcagccaa	600
ccgctgttg tggtcacaat ctcaaatagc aaagacaggg aaattccttg attatattta	660
acttagaact cactcttcct ctacagctaag agaaagagat atccctttca catcccctta	720
gaagctttgc ctgaccgaa taaaagaaaa taacctttat tgagttaaat atcctacctc	780
aaacacatgc acatgtactt acatataata tagtaatttt cttaaagata taaaattgg	840
aaataatata ttattgtaga atattctgaa gtgcacaaat tatttcaaat tgctgttaa	900
taaaaatatt ctagtttatt ttaatctctc agtcggctcc actctattct ttatgtctta	960
cagtttttgc tgtttttggt ttgtcttga cttgacctac ttcgaaagga aaccataaaa	1020
ttgttcatat attcccaaatt cagtgttaata tcaggaaagt ctacacacaa aataatttat	1080
ttcctttctg aatatgggct gtaaacctat cctggttttg tggatttga aattgaatga	1140
aatatgattc agaagctcag ttaggataga ctccaacagg gggaaaaaaa accactctgt	1200
gtatctaacg gtcactaaca tgggtgagttc acatcttccc ttcacccctt agtcacagga	1260
cacacctgta aataggtgac atcagtagat gtcaaagttg tgagacaatc taaagccctt	1320
tcagagaaat ttgacatttc cctgtaagta aatctaactc aaaatgtgtt tcataaaaat	1380
atattatttg ttgcttcagc caggatggaa gggagaagct atttaaaact tgacattctc	1440
ttcctttact tagcccgaga gcggctaaca tctgtgaatt gtgaaattca caaacaggcc	1500
ggcctgagcc ccagccaaat caaacagctt gctccacaaa atgtaaaact taaagggaag	1560

attgcttaac taattaatta tagatttggt aattgcagtt aaagagtttg gctttcttcc 1620
ctgctattag caaatataga tgacctaaat agaaggttct gaaattaaaa ataataaatt 1680
tcctgtgacc acagcccaag tgattccatt tataatgaaa ggtggagtga agatttctag 1740
tgcagagctt ctcaagtttt aatgtgcccg tgaggcacct agaaatcttg ttaatgcaga 1800
ttctggttca gtaggtctgg ggtgaggcct aagactctgc atttctaaca cgttcccagg 1860
ttacttgatg ctgctgggcc ttggaccaca ctttggagtg gcgagcccta gtgttccttc 1920
tagctctgat atttacaatt cgacgtctct aggaaatgag gaagaactct tctaaatatt 1980
ttaaattaac ttccagggat atagactccc aaataatcaa ttgcaaaca tctctagtgt 2040
gttgtgtttt taaaatttaa ttaatttttg ttttttaaaa gttattttta tttattttatt 2100
atttttgaga cagcttcttg cactgtcacc cagactgagt gtagcagcgc gttcattggat 2160
cactgcagcc tcaacctcct gggctcaagt gatccttctg cctcagcttc ctgtgtagct 2220
tggaactacag gtgagcacia ccatacccag gtaattttgt tttgtttgt ttttttagat 2280
atgggggtctt gctgtgttgc cctgactggt ctcaaactgc tggactcaag ctatcctccc 2340
gaccgggtt cccaaagtgt tgggattaca ggcatgagcc accacactca tctatttttt 2400
taaaaaattt aaaaggttta tagcctaacg tatttaata atatcattta aacgtatgtc 2460
atgatttcaa tagttgttat ttaaaaatcc taaagttact aagctaagag gaacagaaat 2520
taaatggcaa caaattttaa ataagtaatt atgaaaaaga ttggctccta ttgcattatg 2580
gaaataaatg gcgagagttg acccaggaaa aagaggcaaa ctctctagaa ttcaacagaa 2640
caccagtagc atgcaaccat acacgatcaa gtgaaaaata agtggcaatc atattataat 2700
taccataatt acttcttata tttatagtgc atccttattc tcttagggga ctaaggttac 2760
tatacaaatg catgaattat atctttgatg tgcaaggtgg aaacttttcc aagactttag 2820
agtcttttag gcagaaattg taatataata acgtacatag aagtctagga aaagcaattg 2880
cctttctgac catgacctgc ctgtttaaat gatgtttgtg aagactttag atttgtatgg 2940
aggggagaag aaagtactta aggaaggaaa ggtgttttgg acttggacca ctgagcataa 3000
cgtaggagaa agggacactt tgttcttctt gactcctagg agccaagaac atgcactctg 3060
ccaaactcag gtgtctatga taaaaattct tctcattac attcatgaaa attattttac 3120
aactgctccc ctcatgcac ttctctctag gtgcatatt tttctggttg ctcttgtgcc 3180
ttggatcata ttctgccctc caccaggaat gttttaaaac tccatctgcg catattcaca 3240
tcttgctcat ccttcaaaga ccaaaaattc tccctctttt ttccacataa aagaaacctt 3300

ccccacttct actgtcctac ataattatat ctgcactttt ttgtgtaagg tcacctataa 3360
ctttcttcct ggagtctagc tatttttgaa tagactcatc tcctgtactg gattgtgaac 3420
agcttgaggg caggcttgct attctaattc atctctgtgt tttcaggagc tagcaaaaat 3480
attgcacctt atggatgaat aacatgttta tgtatttgca aaaatcatct cataataagt 3540
attgcaactg attaaaaata atttccacaa aacacttgac ctcttagagt tactttatga 3600
ggtataatth acatacaatg aaattcgcca attccaagtg ttcagtcctga ggaggtgaca 3660
cattagacac cgagtagcct tcatcgcaat caagattcca acaaccctat taccceaaaa 3720
ctttctcat accactttgc aatcgatctc ccctcacccc tggccttaga caatcactga 3780
cttgcttttt gtttttatag attatgtgta tattttctag aacattgttt tccaatagaa 3840
ctttctgtta taaaggaaat attctatatt tgcaccgtct gatgtggtag ccactagtta 3900
catgtggcta acgctactga agagctaaat ttttattctt acttaattht aatcaactta 3960
aatttgaata gccatgtgag gctactggct actatgttgg acaatacaat gctagaatat 4020
cacataaatg caggcatatg gtacgtattc ttctgtgtct ggattttttt tgctcattga 4080
tgccatgggt tctgagatat attcatgttg tcaactgtat cagtaattca ctcttattat 4140
agctgctgaa cctgtggatc tcttgtttgt ttgttttagct attaagaatg aaatctggtc 4200
ttagatacac aattatggcc agaagtccaa caaacttttt aagagttcaa tcatcacata 4260
tcccagaact tgttcttggt cctcctgagg tctttggcaa aatagtagct tctttcttcc 4320
aagactgcta taactctgaa ggagagagca aatgttgtgt aaagcagttg gctaacctgg 4380
ggtagtagc agctctggta ctaacttact ccagacctc aggcaggtag cctactctct 4440
ttgagcctta gatactttat ttttaaaggg gaaggatgta tcaatcagga ttccttggtt 4500
ataaacaaca gaaactgatt ctgcctacct aaagccaaaa aacacacaaa caaacaaca 4560
aaacatgaaa atgtatgaaa agaaatatga aaattcacag actataagag acagttggaa 4620
aaaaaaccac acatctcaga aagggtgtga accaggataa attataaatt cagggactta 4680
agaaatagga atggacagtc actttgcaaa gccactgtag gcgtaagica gattcaacag 4740
ctttttttga acttcagcta ttcagcttaa gattcaaatt cccaaaagaa agatgccatg 4800
tttgccagg agaggcctga tcatgtggac tgatggccct accatgactg agcagagagt 4860
tttcagaaga aaataaaggt tctgttaacc aaggaaagag caataggtac agggcagttg 4920
aaaacaacag atgccaccac aagaggttta aagcagatga tcttgcatgt tccgtagagc 4980
tctggcagcc tgtgactatg agatcagaga aactgaattc ctltgtgtca gggtaactga 5040

acctcagggtc ctagcctttc caggtcatcc tgcatttata gtgaggagag caggaaagaa 5100
 ccttcaagga gaggagggtg tggagtaa at tcaccaacta ttgctcaa at tgaagagact 5160
 gagtttggtg atttttaatt gtaigacact tttctgtaca tagctgcagc tcaaccacac 5220
 aatctctatt ttagtaaagt ggaagccaaa gttctgtcat ggagaggatc ctgctaactc 5280
 ttccaacttt ggacctaata ttgctacag tctgacatcg attaggagta aagctgggcc 5340
 tagaacttaa gtaaactgaa tggatttcga atgactttaa ttcaatgaaa aagcaagtgc 5400
 attgcaacct tagccatgtg cttcttctga ttgacctcc atctctcttc aggtcactga 5460
 aattcatcaa ataaacattt atagttaagt taatgtcaag aagatgcctt aagggagtggt 5520
 cccaaggaaa gagggcatgc aagggaacag aggccaattg gggcaggaag aggttggcag 5580
 tttctttaac agacaaacct gataccctcc aaagtcacac ccagtgtcca gaagcaatgt 5640
 ggggtgggctt cttttccaga catccctgaa cagctg 5676

<210> 4

<211> 5 6 7 6

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

acggagaaca auuauauaaa auauacacaa auaccugugu auauauagau auaaagccgg 60
 gaggcuaaaa gcaauagggu caaauvcuau cagacauaga aguuuaggca cuucucuccu 120
 ucauacauau uugcaaagag gcggagcguu ucuugauuuu agccaaugag auucaucaau 180
 ugacuaaaac uucauaaaca cucgauucuu accagcuggg cauccucucu acuguuguuc 240
 uuccccucu cucacggcuu cagaguvcuu gacguauagu agccacacuu guuguuggca 300
 auuuggagcu ggaggcaucu cugaacuuu gaucucuguc gugauuggau gcuggcauga 360
 auggcaucag aguuuaauuu cagcagccug gacuuuugua acugaacuga gcugaugagu 420
 guccaccug cuccagcuac auaacacuuc cuuguauvcug gauacugguu ugauuugagg 480
 auuucuguga cuauuucugg ggcuaaaaug uuuguagag cugcuuaggg aaguuuuguu 540
 uuguuuuguu uuucacua uuuccucucc uccccgcccu ucaguuuucc uuucagccaa 600
 ccgcugug ugguacaa cucaauagc aaagacaggg aaauvcuug auuauuuua 660

acuuagaacu	cacucuuccu	cucagcuaag	agaaagagau	aucccuuuc	cauccccuua	720
gaagcuuugc	cugacccgaa	uaaaagaaaa	uaaccuuuau	ugaguuaau	auccuaccuc	780
aaacacaugc	acauguacuu	acauauaaua	uaguaauuuu	cuuaaagaua	uuaaaauugg	840
aaauaauaua	uuauuguaga	auauucugaa	gugcacaauu	uaauucaaau	ugccuguuaa	900
uaaaaauauu	cuaguuuauu	uuaaucucuc	agucggcucc	acucuauucu	uuaugucuaa	960
caguuuuugc	uguuuuuggu	uuugcuuuga	cuugaccuac	uucgaaagga	aaccuauaaa	1020
uuguucauau	auucccaaau	caguguaaua	ucaggaaagu	cuacacacaa	aaauauuuau	1080
uuccuuucug	aaauugggcu	guaaacuuau	ccugguuuug	uggauuugga	aaauugauga	1140
aaauaugauuc	agaagcucag	uuaggauaga	cuccaacagg	gggaaaaaaa	accacucugu	1200
guaucuaacg	gucacuaaca	uggugaguuc	acaucuuccc	uucacccccu	agucacagga	1260
cacaccugua	aaauaggugac	aucaguagau	gucaaaguug	ugagacaauc	uaaagcccuu	1320
ucagagaaau	uugacauuuc	ccuguaagua	aaucuaacuc	aaaauugugu	ucauaaaaau	1380
auuuuauuug	uugcuucagc	caggauggaa	gggagaagcu	auuuuuuacu	ugacauucuc	1440
uuccuuuacu	uagcccgaga	gcggcuaaca	ucugugaauu	gugaaauuca	caaacaggcc	1500
ggccugagcc	ccagccaaa	caaacagcuu	gcuccacaaa	auguaaaacu	uaaagggaag	1560
auugcuuaac	uaauuaaua	uagauuuguu	aaaugcaguu	aaagaguuu	gcuuucucc	1620
cugcuauuag	caaauauaga	ugaccuaaa	agaagguucu	gaaauuaaaa	auaaucuuu	1680
uccugugacc	acagcccaag	ugauuccauu	uaauaugaaa	gguggaguga	agauuucua	1740
ugcagagcuu	cucaaguuuu	aaugugcccg	ugaggcaccu	agaaaucuu	uuauugcaga	1800
uucugguuca	guaggucugg	ggugaggccu	aagacucugc	auuucuaaca	cguucccagg	1860
uuacuugaug	cugcuggucc	uuggaccaca	cuuuggagug	gcgagcccu	guguuccuuc	1920
uagcucugau	auuuacaauu	cgacgucucu	aggaaaugag	gaagaacucu	ucuaaaauu	1980
uuauuuuac	uuccagggau	auagacuccc	aaauaaucua	uuugcaaaca	ucucuagugu	2040
guuguguuuu	uaaaauuuu	uuauuuuuu	uuuuuuuuu	guuauuuuu	uuuauuuuu	2100
auuuuugaga	cagcuucuu	cacugucacc	cagacugagu	guagcagcgc	guucauggau	2160
cacugcagcc	ucaaccuccu	gggcucaagu	gauccuucug	ccucagcuuc	cuguguagcu	2220
uggacuacag	gugagcaca	ccauaccag	guauuuuugu	uuuguuuugu	uuuuuuagau	2280
auggggucuu	gcuguguugc	ccugacuggu	cucaaacugc	uggacucaa	cuaucucccc	2340
gacccggcuu	cccaaagugu	ugggauuaca	ggcaugagcc	accacacuca	ucuauuuuuu	2400

uaaaaaaauuu	aaaagguuuu	uagccuaacg	uauuuuaaua	auaucauuua	aacguauguc	2460
augauuucaa	uaguuguuau	uuaaaaaucc	uaaaguuacu	aagcuaagag	gaacagaaaau	2520
uaaauggcaa	caaauuuuaa	auaaguaauu	augaaaaaga	uuggcuccua	uugcauuuag	2580
gaaauaaaug	gcgagaguug	acccaggaaa	aagaggcaaa	cucucuagaa	uucaacagaa	2640
caccaguagc	augcaaccu	acacgaucaa	gugaaaaaua	aguggcaauc	auuuuauaau	2700
uaccuauuu	acuucuuaua	uuuauaguuc	auccuuauuc	ucuuagggga	cuaagguuac	2760
uauacaaaug	caugaauuau	aucuuugaug	ugcaaggugg	aaacuuuucc	aagacuuuag	2820
agucuuuuag	gcagaaaauug	uaauauaaua	acguacauag	aagucuagga	aaagcaauug	2880
ccuuucugac	caugaccugc	cuguuuuauu	gauguuugug	aagacuuuag	auuuguaugg	2940
aggggagaag	aaaguacuua	aggaaggaaa	gguguuuugg	acuuggacca	cugagcauaa	3000
cguaggagaa	agggacacuu	uguucuuucu	gacuccuagg	agccaagaac	augcacucug	3060
ccaaacucag	gugucuanga	uacaaaauuc	ucucacuuac	auucaugaaa	auuauuuuac	3120
aacugcuccc	cuucaugcac	uuuccucuag	guugcauauu	uuucugguug	cucuugugcc	3180
uuggaucaua	uucugcccuc	caccaggaau	guuuuuaaac	uccaucugcg	cauauucaca	3240
ucuugcucau	ccuucuaaga	ccaaaaauuc	ucccucuuiu	uuccacauaa	aagaaaccuu	3300
ccccacuucu	acuguccuac	auaauuauau	cugcacuuuu	uuguguaagg	ucaccuauaa	3360
cuuucuuccu	ggagucuagc	uauuuuugaa	uagacucauc	uccuguacug	gauugugaac	3420
agcuugaggg	caggcuugcu	auucuaauuc	aucucugugu	uuucaggagc	uagcaaaaau	3480
auugcaccua	auggaugaau	aacauguuuu	uguauuugca	aaaaucaucu	cauauaagu	3540
auugcaacug	auuaaaaaua	auuuccacaa	aacacuugac	cucuuaagagu	uacuuuanga	3600
gguaauuuu	acauacaau	aaauucgcca	auuccaagug	uucagucuga	ggaggugaca	3660
cauuagacac	cgaguagccu	ucaucgcaau	caagauucca	acaaccuau	uacccccaaa	3720
cuuuccucau	accacuugc	aaucgaucuc	cccucacccc	uggccuuaga	caaucacuga	3780
cuugcuuuuu	guuuuuauag	auuaugugua	uauuuucuag	aacauuguuu	uccauuagaa	3840
cuuucuguua	uaaaggaaa	auucuaauuu	ugcaccgucu	gaugugguag	ccacuaguua	3900
cauguggcua	acgcuaacuga	agagcuaaa	uuuuauucuu	acuuauuuuu	aaucaacuua	3960
aaauugaaua	gccaugugag	gcuacuggcu	acuauguugg	acaauacaau	gcuagaauau	4020
cacauaaaug	caggcauau	guacguauuc	uucugugucu	ggauuuuuuu	ugcucauuga	4080
ugccaugguu	ucugagauau	auucauguug	ucaacuguau	caguaauuca	cucuauuuau	4140

agcugcugaa ccuguggauc ucuuguuugu uuguuuagcu auuaagaaug aaucugguc 4200
 uuagauacac aaauauggcc agaaguccaa caaacuuuuu aagaguucac ucaucacaua 4260
 ucccagaacu uguucuuggu ccuccugagg ucuuuggcaa aaaguagcu ucuuucucc 4320
 aagacugcua uaacucugaa ggagagagca aauguugugu aaagcaguug gcuaaccugg 4380
 gguuaguacg agcucuggua cuaacuuacu cccagaccuc aggcagguag ccuacucucu 4440
 uugagccuaa gauacuuuau uuuuaaaggg gaaggaugua ucaaucagga uuccuugggu 4500
 auaaacaaca gaaacugauu cugccuaccu aaagccaaaa aacacacaaa caaacaaca 4560
 aaacaugaaa auguaugaaa agaaauauga aaauucacag acuauaagag acaguuggaa 4620
 aaaaaaccac acaucucaga aagggcugua accaggauaa auuauaaau cagggacuua 4680
 agaaauagga auggacaguc acuuugcaaa gccacuguag gcguaaguca gauucaacag 4740
 cuuuuuuuga acuucagcua uucagcuuaa gauucaaaau cccaaaagaa agauggcaug 4800
 uuuggccagg agaggccuga ucauguggac ugauggcccu accaugacug agcagagagu 4860
 uuucagaaga aaauaaaggu ucuguuaacc aaggaaagag caauagguac agggcagugg 4920
 aaaacaacag augccaccac aagaggcuua aagcagauga ucuugcaugu uccguagagc 4980
 ucuggcagcc ugugacuaua agaucagaga aacugaauuc cuuuguguca ggguaacuga 5040
 accucagguc cuagccuuuc caggucaucc ugcauuuaua gugaggagag caggaaagaa 5100
 ccuucagga gaggaggugg uggaguuaau ucaccaacua uugcucaauu ugaagagacu 5160
 gaguuuggug auuuuuuauu guaugacacu uuucuguaca uagcugcagc ucaaccacac 5220
 aaucucuauu uuaguuaagu ggaagccaaa guucugucau ggagaggau cugcuaacuc 5280
 uucaacuua ggaccuaaua uuugcuacag ucugacaucg auuaggagua aagcugggcc 5340
 uagaacuuaa guaaacugaa uggauuucga augacuuaa uucaaugaaa aagcaagugc 5400
 auugcaaccu uagccaugug cuucuucuga uuugaccucc aucucucuuc aggucacuga 5460
 aaaucaucua auaaacauuu auaguuaagu uaaugucaag aagaugccuu aaggagugu 5520
 cccaaggaaa gagggcaugc aagggaacag aggccauug gggcaggaag agguuggcag 5580
 uuucuuaac agacaaaccu gauaccucc aaagucacac ccagugucca gaagcaaugu 5640
 gggugggcuu cuuuuccaga cauccugaa cagcug 5676

<210> 5

<211> 2 5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

cgttgatatac aaagacagtt gaagg 25

<210> 6

<211> 2 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

gtccatgcta atctcaatct tgtttg 26

<210> 7

<211> 2 3

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 7

ccatgtccca gagcacacag aca 23

<210> 8

<211> 2 3

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

ctatgggtac actgatcggt ttg 23

<210> 9

<211> 3 0 8

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> gene encoding 5' UTR of p51AmRNA and 165 bases in ORF of p51AmRNA.

<400> 9

cgttgatata aaagacagtt gaaggaaatg aattttgaaa cttcacgggtg tgccacccta 60
cagtactgcc ctgaccctta catccagcgt ttcgtagaaa cccagctcat ttctcttgga 120
aagaaagtta ttaccgatcc accatgtccc agagcacaca gacaaatgaa ttctcagtc 180
cagaggtttt ccagcatata tgggattttc tggaacagcc tatatgttca gttcagccca 240
ttgacttgaa ctttgtggat gaaccatcag aagatgggtgc gacaaacaag attgagatta 300
gcatggac 308

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

tctgggtgacagtgaagaagctgtctc 28

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cttcataaacactcgattcttaccagctgg 30

<210> 12

<211> 13940

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Plasmid gene containing p5l promoter and neomycin resistance gene

<400> 12

cccgggaggt accgggcccc ccctcgaggt cgacggtatc gataagcttg atctgttcag	60
ggatgtcttg aaaagaagcc caccacatt gcttctggac actgggtgtg actttggagg	120
gtatcaggtt tgtctgttaa agaaactgcc aacctcttcc tgccccaatt ggcctctgtt	180
cccttgcatg ccctctttcc ttgggacact cccttaaggc atcttcttga cattaactta	240
actataaatg tttatttgat gaatttcagt gacctgaaga gagatggagg tcaaatacaga	300
agaagcacat ggctaagggt gcaatgcact tgctttttca ttgaattaaa gtcattcgaa	360
taccattcag ttactttaag ttctaggccc agctttactc ctaatcgatg tcagactgta	420
gcaaataatta ggtccaaagt tggaagagtt agcaggatcc tctccatgac agaactttgg	480
cttccacttt actaaaatag agattgtgtg gttgagctgc agctatgtac agaaaagtgt	540
catacaatta aaaataacca aactcagtct cttcaatttg agcaatagtt ggtgaattta	600
ctccaccacc tcctctcctt gaaggttctt tcctgctctc ctactataa atgcaggatg	660
acctggaaag gctaggacct gaggttcagt taccctgaca caaaggaatt cagtttctct	720
gatctcatag tcacaggctg ccagagctct acggaacatg caagatcctc tgctttaagc	780
ctcttggtgtt ggcactgtgt gttttccact gccctgtacc tattgctctt tccttggtta	840
acagaacctt tattttcttc tgaaaactct ctgctcagtc atggtagggc catcagttca	900
catgatcagg cctctcctgg ccaaacatgg catctttctt ttgggaattt gaatcttaag	960
ctgaatagct gaagttcaaa aaaagctgtt gaatctgact tacgcctaca gtggctttgc	1020
aaagtgactg tccattccta tttcttaagt ccctgaattt ataatttctc ctggttacag	1080
ccctttctga gatgtgtgtt tttttttcca actgtctctt atagtctgtg aattttcata	1140
tttcttttca tacattttca tgttttgttt gtttgtttgt gtgttttttg gctttaggta	1200
ggcagaatca gtttctgttg tttataccca aggaatcctg attgatacat ccttccccctt	1260
taaaaataaa gtatctaagg ctcaaagaga gtaggctacc tgcctgaggt ctgggagtaa	1320
gttagtacca gagctcgtac taaccccgagg ttagccaact gctttacaca acatttctc	1380
tctccttcag agttatagca gtcttggaag aaagaagcta ctattttgcc aaagacctca	1440
ggaggacca gaacaagttc tgggatatgt gatgattgaa ctcttaaaaa gtttgttgga	1500
cttctggcca taattgtgta tctaagacca gatttcattc ttaatagcta aacaaacaaa	1560
caagagatcc acaggttcag cagctataat aagagtgaat tactgataca gttgacaaca	1620

tgaatatatc tcagaaacca tggcatcaat gagcaaaaaa aatccagaca cagaagaata 1680
cgtaccatat gcctgcattt atgtgatatt ctagcattgt attgtccaac atagtagcca 1740
gtagcctcac atggctattc aaatttaagt tgattaaaat taagtaagaa taaaaattta 1800
gctcttcagt agcgttagcc acatgtaact agtggctacc acatcagacg gtgcaaatat 1860
agaatatattc ctttataaca gaaagttcta ttggaaaaca atgttctaga aaatatacac 1920
ataatctata aaaacaaaaa gcaagtcagt gattgtctaa ggccaggggt gaggggagat 1980
cgattgcaaa gtggtatgag gaaagttttg gggtaatagg gttgttgga tcttgattgc 2040
gatgaaggct actcgggtgc taatgtgtca cctcctcaga ctgaacactt ggaattggcg 2100
aatttcattg tatgtaaatt atacctata aagtaactct aagagggtcaa gtgttttgtg 2160
gaaattattt ttaatcagtt gcaatactta ttatgagatg atttttgcaa atacataaac 2220
atgttattca tccattaggt gcaatatattt tgctagctcc tgaaaacaca gagatgaatt 2280
agaatagcaa gcctgcctc aagctgttca caatccagta caggagatga gtctattcaa 2340
aaatagctag actccaggaa gaaagttata ggtgacctta cacaaaaaag tgcagatata 2400
attatgtagg acagtagaag tggggaagggt ttcttttatg tggaaaaaag agggagaatt 2460
tttggtcttt gaaggatgag caagatgtga atatgcgag atggagtttt aaaacattcc 2520
tggtggaggg cagaatatga tccaaggcac aagagcaacc agaaaaatat gcaacctaga 2580
ggaaagtgca tgaaggggag cagttgtaaa ataattttca tgaatgtaag tgagaagaat 2640
ttgtatcata gacacctgag tttggcagag tgcatttct tggctcctag gagtcaagaa 2700
gaacaaagtg tccctttctc ctacgttatg ctcatgggtc caagtccaaa acacctttcc 2760
ttccttaagt actttcttct cccctccata caaatctaaa gtcttcacaa acatcattta 2820
aacaggcagg tcatggtcag aaaggcaatt gcttttctta gacttctatg tacgttatta 2880
tattacaatt tctgcctaaa agactctaaa gtcttggaag agtttccacc ttgcacatca 2940
aagatataat tcatgcattt gtatagtaac cttagtcccc taagagaata aggatgaact 3000
ataaatataa gaagtaatta tggtaattat aatatgattg ccacttattt ttcacttgat 3060
cgtgtatggg tgcattgtac tgggtgtctg ttgaattcta gagagtttgc ctctttttcc 3120
tgggtcaact ctgccattt atttccataa tgcaatagga gccaatcttt ttcataatta 3180
cttattttaa atttgttgcc atttaatttc tgttctctt agcttagtaa ctttaggatt 3240
tttaaataac aactattgaa atcatgacat acgttttaa gatattattt aaatacgtaa 3300
ggctataaac cttttaaat ttttaaaaaa atagatgagt gtgggtggctc atgcctgtaa 3360

tcccaacact ttgggaagcc gggtcgggag gatagcttga gtccagcagt ttgagaccag 3420
tcagggcaac acagcaagac cccatatcta aaaaaacaaa acaaaacaaa attacctggg 3480
tatggttgtg ctccacctgta gtccaagcta cacaggaagc tgaggcagaa ggatcacttg 3540
agcccaggag gttgaggctg cagtgatcca tgaacgcgct gctacactca gtctgggtga 3600
cagtgcaga agctgtctca aaaataataa ataaataaaa ataactttta aaaaacaaaa 3660
attaattaaa ttttaaaaac acaacacact agagatgttt gcaaattgat tat ttgggag 3720
tctatatccc tggaagttaa tttaaaatat ttagaagagt tcttcctcat ttcctagaga 3780
cgtcgaattg taaatatcag agctagaagg aacactaggg ctgccactc caaagtgtgg 3840
tccaaggacc agcagcatca agtaacctgg gaacgtgtta gaaatgcaga gtcttaggcc 3900
tcaccccaga cctactgaac cagaatctgc attaacaaga tttctaggtg cctcacgggc 3960
acattaaaac ttgagaagct ctgcactaga aatcttctact ccacctttca ttataaatgg 4020
aatcacttgg gctgttgtca caggaaattg attattttta atttcagaac cttctattta 4080
ggtcacttat atttgctaag agcagggaag aaagccaaac tctttaactg caattaacaa 4140
atctataatt aattagttaa gcaatcttcc ctttaagttt tacat ttgtg ggagcaagct 4200
gtttgatattg gctggggctc aggccggcct gtttgtgaat ttcacaattc acagatgtta 4260
gccgctctcg ggctaagtaa aggaagagaa tgtcaagttt taaatagctt ctcccttcca 4320
tcctggctga agcaacaaat aaaatat tttt tatgaaacac attttgagtt agatttactt 4380
acagggaaat gtcaaatttc tctgaaaggg ctttagattg tctcacaact ttgacatcta 4440
ctgatgtcac ctattttacag gtgtgtcctg tgactagggg gtgaagggaa gatgtgaact 4500
caccatgtta gtgaccgtta gatacacaga gtgggttttt tccccctgt tggagtctat 4560
cctaactgag cttctgaatc atatttcatt caatttccaa atccacaaaa ccaggataag 4620
tttacagccc atattcagaa aggaaataaa ttattttgtg tgtagacttt cctgatatta 4680
cactgatttg ggaatatatg aacaatttta tggtttcctt tcgaagtagg tcaagtcaaa 4740
gcaaaaccaaa aaacagcaaa aactgtaaga cataaagaat agagtggagc cgactgagag 4800
attaaaataa actagaatat ttttattaac aggcaatttg aaataatttg tgcacttcag 4860
aatattctac aataatatat tatttccaat ttttaatatct ttaagaaaat tactatatta 4920
tatgtaagta catgtgcatg tgtttgaggt aggatattta actcaataaa ggttattttc 4980
ttttattcgg gtcaggcaaa gcttctaagg ggatgtgaaa gggatatctc tttctcttag 5040
ctgagaggaa gagtgagttc taagttaaata ataatcaagg aatttccctg tctttgctat 5100

ttgagattgt gaccacaaca ggcggttggc tgaaagggaa actgaagggc ggggagggag 5160
ggaaatagat gaaaaaaca aacaaaaca aacttccta agcagctcta caaaacattt 5220
tagccccaga aatagtcaca gaaatcctca aatcaaacca gtatccagat acaaggaagt 5280
gttatgtagc tggagcaggg tggacactca tcagctcagt tcagttacaa aagtccaggc 5340
tgctgaaatt aaactctgat gccattcatg ccagcatcca atcacgacag agatcagaag 5400
ttcagagatg cctccagctc caaattgcc aacaacaagt tggctactat acgtcaagga 5460
ctctgaagcc gtgagagagg gggaagaaca acagtagaga ggatgccag ctggtaagaa 5520
tcgagtgttt atgaagtttt agtcaattga tgaatctcat tggctaaaat caagaaacgc 5580
tccgcctctt tgcaaatatg tatgaaggag agaagtgcct aaacttctat gtctgatagc 5640
atttgaccct attgctttta gcctcccggc tttatatcta tatatacaca ggtatttgtg 5700
tatattttat ataattgttc tccgttcgtt gatgggggat ccactagtgc tagagcggcc 5760
tcgagatcta agtaagcttg gcattccggt actgttggtt aaatggaaga cgccaaaaac 5820
ataaagaaag gcccggcgcc attctatcct ctagaggatg gaaccgctgg agagcaactg 5880
cataaggcta tgaagagata cgccctggtt cctggaacaa ttgcttttac agatgcacat 5940
atcgaggtga acatcacgta cgcggaatac ttcgaaatgt ccgttcggtt ggcagaagct 6000
atgaaacgat atgggctgaa tacaatcac agaatcgctg tatgcagtga aaactctctt 6060
caattcttta tgccggtgtt gggcgcgtta tttatcggag ttgcagttgc gcccgcgaaac 6120
gacatttata atgaacgtga attgctcaac agtatgaaca tttcgcagcc taccgtagtg 6180
tttgtttcca aaaaggggtt gcaaaaaatt ttgaacgtgc aaaaaaaatt accaataatc 6240
cagaaaatta ttatcatgga ttctaaaacg gattaccagg gatttcagtc gatgtacacg 6300
ttcgtcacat ctcatctacc tcccggtttt aatgaatacg attttgtacc agagtccttt 6360
gatcgtgaca aaacaattgc actgataatg aattcctctg gatctactgg gttacctaa 6420
gggtgtggccc ttccgcatag aactgcctgc gtcagattct cgcatgccag agatcctatt 6480
tttggcaatc aaatcattcc ggatactgcg attttaagt tttttccatt ccatcacggt 6540
tttggaatgt ttactacact cggaatattg atatgtggat ttcgagtcgt cttaatgtat 6600
agatttgaag aagagctgtt tttacgatcc cttcaggatt acaaaattca aagtgcgttg 6660
ctagtaccaa ccctattttc attcttcgcc aaaagcactc tgattgacaa atacgattta 6720
tctaatttac acgaaattgc ttctgggggc gcacctcttt cgaaagaagt cggggaagcg 6780
gttgcaaac gcttccatct tccagggata cgacaaggat atgggctcac tgagactaca 6840

tcagctattc tgattacacc cgagggggat gataaaccgg gcgcggtcgg taaagttggt 6900
ccattttttg aagcgaaggt tgtggatctg gataccggga aaacgctggg cgttaatcag 6960
agaggcgaat tatgtgtcag aggacctatg attatgtccg gttatgtaaa caatccggaa 7020
gcgaccaacg ccttgattga caaggatgga tggctacatt ctggagacat agcttactgg 7080
gacgaagacg aacacttctt catagttgac cgcttgaagt ctttaattaa atacaaagga 7140
tatcaggtgg ccccgctga attggaatcg atattgttac aacaccccaa catcttcgac 7200
gcgggcgtgg caggctcttc cgacgatgac gccggtgaac ttcccgccgc cgttgtttgtt 7260
ttggagcacg gaaagacgat gacggaaaaa gagatcgtgg attacgtggc cagtcaagta 7320
acaaccgcga aaaagttgcg cggaggagtt gtgtttgtgg acgaagtacc gaaaggtctt 7380
accgaaaaac tcgacgcaag aaaaatcaga gagatcctca taaaggccaa gaagggcgga 7440
aagtccaaat tgtaaaatgt aactgtattc agcgatgacg aaattcttag ctattgtaat 7500
actgcgatga gtggcagggc ggggcgtaat ttttttaagg cagttattgg tgcctttaa 7560
cgcttggtgc tacgcctgaa taagtataa taagcggatg aatggcagaa attcgccgga 7620
tctttgtgaa ggaaccttac ttctgtggtg tgacataatt ggacaaacta cctacagaga 7680
tttaaagctc taaggtaa ataaaaat ttaagtgtata atgtgttaaa ctactgattc 7740
taattgtttg tgtatttttag attccaacct atggaactga tgaatgggag cagtgggtga 7800
atgcctttta tgaggaaaac ctgttttgct cagaagaaat gccatctagt gatgatgagg 7860
ctactgctga ctctcaacat tctactcctc caaaaaagaa gagaaaggta gaagacccca 7920
aggactttcc ttcagaattg ctaagttttt tgagtcatgc tgtgtttagt aatagaactc 7980
ttgcttgctt tgctatttac accacaaagg aaaaagctgc actgctatac aagaaaatta 8040
tgaaaaaata ttctgtaacc ttataagta ggcataacag ttataatcat aacatactgt 8100
ttttcttac tccacacagg catagagtgt ctgctattaa taactatgct caaaaattgt 8160
gtacctttag ctttttaatt tgtaaagggg ttaataagga atatttgatg tatagtgcct 8220
tgactagaga tcataatcag ccataaccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac 8280
ctccacaccc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg 8340
tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa 8400
gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat 8460
gtctggatcc ggctgtggaa tgtgtgtcag ttaggggtgtg gaaagtcgcc aggtcccca 8520
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcctctc aattagtcag caaccatagt cccgcccta 8580

actccgcccc tcccccccct aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga 8640
ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag 8700
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agcttcacgc tgccgcaagc 8760
actcagggcg caagggctgc taaaggaagc ggaacacgta gaaagccagt ccgcagaaac 8820
ggtgctgacc ccgatgaat gtcagctact gggctatctg gacaagggaa aacgcaagcg 8880
caaagagaaa gcaggtagct tgcagtgggc ttacatggcg atagctagac tgggcggttt 8940
tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag gttgggaagc 9000
cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc aggggatcaa 9060
gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg 9120
caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggtta tgactgggca caacagacaa 9180
tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccc gttctttttg 9240
tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt 9300
ggctggccac gacgggcgtt ccttgccgag ctgtgctcga cgttgctact gaagcgggaa 9360
gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc 9420
ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg 9480
ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt actcggatgg 9540
aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg 9600
aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacccatg 9660
gcgatgcctg cttgccgaat atcatgggtg aaaatggccg cttttctgga ttcatacgact 9720
gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg 9780
ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggg atcgccgctc 9840
ccgattcgca gcgcatacgc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga gcgggactct 9900
ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt tcgattccac 9960
cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat 10020
cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt ctccgccac cccgggctcg atccccctgc 10080
gagttggttc agctgctgcc tgaggctgga cgacctcgcg gagttctacc ggcagtgcaa 10140
atccgtcggc atccaggaaa ccagcagcgg ctatccgcgc atccatgccc ccgaactgca 10200
ggagtgggga ggcacgatgg ccgctttggt cccggatctt tgtgaaggaa ccttacttct 10260
gtggtgtgac ataattggac aaactaccta cagagattta aagctctaag gtaaataata 10320

aatttttaag tgtataatgt gttaaaactac tgattctaata tgtttgtgta ttttagattc 10380
caacctatgg aactgatgaa tgggagcagt ggtggaatgc ctttaatgag gaaaacctgt 10440
tttgctcaga agaaatgccca tctagtgatg atgaggctac tgctgactct caacattcta 10500
ctcctccaaa aaagaagaga aaggtagaag accccaagga ctttccttca gaattgctaa 10560
gttttttgag tcatgctgtg tttagtaata gaactcttgc ttgctttgct atttacacca 10620
caaaggaaaa agctgcactg ctatacaaga aaattatgga aaaatattct gtaaccttta 10680
taagtaggca taacagttat aatcataaca tactgttttt tcttactcca cacaggcata 10740
gagtgtctgc tattaataac tatgctcaaa aattgtgtac ctttagcttt ttaatttgta 10800
aaggggttaa taaggaatat ttgatgtata gtgccttgac tagagatcat aatcagccat 10860
accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg 10920
aaacataaaa tgaatgcaat tgttggtgtt aacttgttta ttgcagctta taatgggttac 10980
aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt 11040
tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatccgtcg accgatgccc 11100
ttgagagcct tcaaccagcag cagctccttc cgggtgggcgc ggggcatgac tatcgtcgcc 11160
gcacttatga ctgtcttctt tatcatgcaa ctcgtaggac aggtgccggc agcgctcttc 11220
cgcttcctcg ctcaactgact cgctgcgctc ggtcggttcgg ctgcggcgag cgggtatcagc 11280
tcactcaaag gcggtaatac gggtatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat 11340
gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcggtttt 11400
ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg 11460
aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc 11520
tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt 11580
ggcgctttct caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa 11640
gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggttaacta 11700
tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa 11760
caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa 11820
ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt 11880
cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt 11940
ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat 12000
cttttctacg gggtctgacg ctcaagtggaa cgaaaactca cgtaaggga ttttggtcat 12060

gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaataaaaaatgaa gttttaaatc 12120
aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc 12180
acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta 12240
gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga 12300
cccacgtca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg 12360
cagaagtggc cctgcaactt tatccgctc catccagtct attaattggt gccgggaagc 12420
tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat 12480
cgtgggtgca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag 12540
gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agtccttcg gtcctccgat 12600
cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 12660
ttctcttact gtcattgcat ccgtaagatg cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa 12720
gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga 12780
taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg 12840
gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac cactcgtgc 12900
acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg 12960
aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aatgttgaa tactcatact 13020
cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat 13080
atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt 13140
gccacctgac gcgccctgta gcggcgcat aagcgcggcg ggtgtggtgg ttacgcgcag 13200
cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gccgcctcct ttcgctttct tcccttcctt 13260
tctcgccacg ttcgccggtt ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttaggggt 13320
ccgatttagt gctttacggc acctcgacct caaaaaactt gattaggggt atggttcacg 13380
tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgcccttg acgttgaggt ccacgttctt 13440
taatagtgga ctcttggtcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg tctattcttt 13500
tgatttataa gggattttgc cgatttcggc ctattggta aaaaatgagc tgatttaaca 13560
aaaatttaac gcgaatttta acaaaatatt aacgtttaca atttccatt cgccattcag 13620
gctgcgcaac tgttggaag ggcgatcggc gcgggcctct tcgctattac gccagcccaa 13680
gctacatga taagtaagta atattaaggt acgtggaggt ttacttgct ttaaaaaacc 13740
tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgttggt gtttaactgt 13800

ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag 13860
catttttttc actgcattct agttgtgggt tgcctaaact catcaatgta tcttatggta 13920
ctgtaactga gctaacataa 13940

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04261

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/10, C12N 5/10, C12Q 1/68, A61K 48/00,
A61K 45/00, A61P 43/00, A61P 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/10, C12N 5/10, C12Q 1/68, A61K 48/00,
A61K 45/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Motonobu Osada et al., "Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53", Nature Medicine (1998), Vol.4, No.7, p.839-843	1-11
X	Martin Augustin et al., "Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related Ket gene to Chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse Chromosome 16", Mammalian Genome (1998), Vol.9, No.11, p.899-902	1-11
X	Hartwig Schmale et al., "A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53", Oncogene (1997), Vol.15, No.11, p.1363-1367	1-11
P,X	WO, 99/50412, A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 07 October, 1999 (07.10.99) (Family: none)	1-11
P,X	WO, 99/61610, A2 (FRAUNHOFER GES FOERDERUNG ANGEWANDTEN), 02 December, 1999 (02.12.99) & DE, 19822985, C1	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 September, 2000 (14.09.00)

Date of mailing of the international search report
26 September, 2000 (26.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 15/10, C12N 5/10, C12Q 1/68, A61K 48/00,
A61K 45/00, A61P 43/00, A61P 35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 15/10, C12N 5/10, C12Q 1/68, A61K 48/00,
A61K 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Motonobu Osada et al., "Cloning and functional analysis of human <i>p51</i> , which structurally and functionally resembles <i>p53</i> ", Nature Medicine (1998), Vol.4, No.7, p.839-843	1-11
X	Martin Augustin et al., "Cloning and chromosomal mapping of the human <i>p53</i> -related <i>KET</i> gene to Chromosome 3q27 and its murine homolog <i>Ket</i> to mouse Chromosome 16", Mammalian Genome (1998), Vol.9, No.11, p.899-902	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.09.00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Hartwig Schmale et al., "A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53", Oncogene (1997) , Vol. 15 , No. 11 , p. 1363-1367	1-11
P, X	WO, 99/50412, A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 7. 10月. 1999 (07. 10. 99) ファミリーなし	1-11
P, X	WO, 99/61610, A2 (FRAUNHOFER GES FOERDERUNG ANGEWANDTEN) 2. 12月. 1999 (02. 12. 99) & DE, 19822985, C1	1-11

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 E5295-00	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04261	国際出願日 (日.月.年) 28.06.00	優先日 (日.月.年) 29.06.99
出願人(氏名又は名称) 酒井 敏行		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/10, C12N 5/10, C12Q 1/68, A61K 48/00,
A61K 45/00, A61P 43/00, A61P 35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/10, C12N 5/10, C12Q 1/68, A61K 48/00,
A61K 45/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

.Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Motonobu Osada et al., "Cloning and functional analysis of human <i>p51</i> , which structurally and functionally resembles <i>p53</i> ", Nature Medicine (1998), Vol.4, No.7, p.839-843	1-11
X	Martin Augustin et al., "Cloning and chromosomal mapping of the human <i>p53</i> -related <i>KET</i> gene to Chromosome 3q27 and its murine homolog <i>Ket</i> to mouse Chromosome 16", Mammalian Genome (1998), Vol.9, No.11, p.899-902	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14.09.00

国際調査報告の発送日

26.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Hartwig Schmale et al., "A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53", Oncogene (1997) , Vol.15 , No.11 , p.1363-1367	1 - 1 1
P, X	WO, 99/50412, A1 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 7.10月.1999 (07.10.99) ファミリーなし	1 - 1 1
P, X	WO, 99/61610, A2 (FRAUNHOFER GES FOERDERUNG ANGEWANDTEN) 2.12月.1999 (02.12.99) & DE, 19822985, C1	1 - 1 1